

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1925 - 1926

N^o 12

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(PHARMACIE)

présentée et soutenue le 1926

PAR **Mademoiselle Laure SEGUIN**

Pharmacien de 1^{re} classe

Lauréate de la Faculté de Pharmacie de Paris (médaille d'or)

Licenciée ès Sciences

Préparateur au Laboratoire National de Contrôle des Médicaments

RECHERCHES SUR LA
PHAGOCYTOSE IN VITRO
VIRULENCE & PHAGOCYTABILITÉ

JURY

MM. RADAIS, *Président.*

GRIMBERT, *Professeur.*

LUTZ, *Agrégé.*

PARIS

VIGOT FRÈRES, EDITEURS

23, RUE DE L'ÉCOLE DE MÉDECINE, 23

1926

THÈSE
POUR LE DOCTORAT
EN PHARMACIE



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1925 - 1926

N° 12

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(PHARMACIE)

présentée et soutenue le

1926

PAR **Mademoiselle Laure SEGUIN**

Pharmacien de 1^{re} classe

Lauréate de la Faculté de Pharmacie de Paris (médaille d'or)

Licenciée ès Sciences

Préparateur au Laboratoire National de Contrôle des Médicaments

RECHERCHES SUR LA PHAGOCYTOSE IN VITRO VIRULENCE & PHAGOCYTABILITÉ

JURY

MM. RADAIS, *Président.*

GRIMBERT, *Professeur.*

LUTZ, *Agrégé.*

PARIS

VIGOT FRÈRES, EDITEURS

23, RUE DE L'ÉCOLE DE MÉDECINE, 23

1926

Personnel de la Faculté de Pharmacie

ADMINISTRATION

MM. RADAIS, *Doyen*, O. ✱, ☼ I.
 PERROT, *Assesseur*, O. ✱, ☼ I.
 G. DURSENT, *Secrétaire*, ✱, ☼ I.

PROFESSEURS

MM. GUIGNARD, Membre de l'Institut, C. ✱, ☼ I.	Botanique générale.
H. GAUTIER, O. ✱, ☼ I.	Chimie minérale.
RADAIS, O. ✱, ☼ I.	Cryptogamie et Microbiologie.
BÉHAL, Membre de l'Institut, C. ✱, ☼ I.	Chimie organique.
PERROT, O. ✱, ☼ I.	Histoire naturelle des médicaments.
COUTIÈRE, ✱, ☼ I.	Zoologie.
BERTHELOT, Membre de l'Institut, ☼ I.	Physique.
GRIMBERT, ✱, ☼ I.	Chimie biologique.
LEBEAU, O. ✱, ☼ I.	Pharmacie chimique.
DELÉPINE, O. ✱, ☼ I.	Hydrologie et Hygiène.
GUERBET, ✱, ☼ I.	Toxicologie.
BOUGAULT, ✱, ☼ I.	Chimie analytique.
GORIS, ✱, ☼ I.	Pharmacie galénique.

Doyens honoraires : MM. GUIGNARD, C. ✱, ☼ I. et H. GAUTIER, O. ✱, ☼ I.
Professeurs honoraires : MM. MOUREU, G.O. ✱, ☼ I. et A. VILLIERS, ✱, ☼ I.

CHARGÉS DE COURS

MM. TASSILLY, ✱, ☼ I.	Minéralogie.
Marc HONNORAT, ✱, ☼ I.	Législation et Déontologie pharmaceutiques.
LUTZ, ✱, ☼ I.	Cryptogamie.
GUÉRIN, ✱, ☼ I.	Botanique.



AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. SOMMELET, ✱, ☼ I.	MM. TASSILLY, ✱, ☼ I.	MM. LAUNOY, ✱, ☼ I.
DAMIENS, ☼ I.	GUÉRIN, ✱, ☼ I.	HÉRISSEY, ✱, ☼ I.
	LUTZ, ✱, ☼ I.	

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DEFACQZ, ✱, ☼ I.	Chimie générale.
COUSIN, ✱, ☼ I.	Chimie analytique.
SOUÈGES, ☼ I.	Micrographie.
LEROUX, ☼ I.	Physique.
DEVAL, ☼ I.	Microbiologie.
FRANÇOIS, ✱, ☼ I.	Travaux généraux de 4 ^e année.

Bibliothécaire en Chef : M. BEAULIEUX, ☼ I.

A MES PARENTS

*Témoignage de ma profonde
affection et de ma vive
reconnaissance.*

A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS

A Monsieur le Professeur M. RADAIS
DOYEN DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

auquel nous adressons l'expression de notre respectueuse gratitude pour l'intérêt qu'il a bien voulu porter à nos travaux.

A Monsieur le Docteur M. NICOLLE
PROFESSEUR A L'INSTITUT PASTEUR

Témoignage de notre reconnaissance pour l'accueil bienveillant qu'il nous a réservé dans son laboratoire et la direction constante et éclairée qu'il a bien voulu donner à nos recherches.

A Monsieur le Docteur-Vétérinaire E. CESARI
CHEF DE LABORATOIRE A L'INSTITUT PASTEUR

que nous sommes heureuse de remercier ici pour les précieux conseils qu'il n'a cessé de nous prodiguer au cours de notre travail.

HISTORIQUE — INTRODUCTION

La Phagocytose est le phénomène qui consiste en l'englobement, suivi parfois de la dissolution, de particules inertes ou organisées par certaines cellules fixes ou mobiles. Dans les organismes supérieurs, les plus actives de ces cellules sont les globules blancs ou leucocytes, qui, à cause de cette fonction, sont appelés Phagocytes.

L'importance très grande de ce phénomène dans la lutte de l'organisme contre les microbes, agents des maladies infectieuses, n'est plus actuellement mise en doute. Il n'en fut pas de même lorsque METCHNIKOFF énonça sa « théorie des phagocytes ». Ses contradicteurs furent nombreux et de vives discussions s'engagèrent. On pensait alors que les microbes que l'on pouvait voir à l'intérieur des leucocytes n'étaient pas en lutte avec ceux-ci, qui servaient au contraire à les transporter et à les disséminer dans l'organisme. On niait tout rôle utile de ces cellules dans la lutte de l'organisme contre les bactéries qui l'avaient envahi. Les beaux travaux de METCHNIKOFF ne purent permettre bientôt aucun doute sur le rôle très important joué par les leucocytes dans l'immunité contre les maladies infectieuses. Ce savant montra que l'englobement des microbes par les phagocytes est un fait facile à observer, que ces microbes sont vivants lorsqu'ils sont phagocytés, et que l'on peut voir dans ce phénomène une analogie avec les phénomènes de digestion intracellulaire des cellules amiboïdes des animaux inférieurs. Il commença ses travaux par l'étude de ces derniers, pour s'élever ensuite dans l'échelle animale jusqu'à l'organisme humain. L'on peut suivre cette étude en consultant la série des mémoires intitulés « Etudes sur l'Immunité » publiés sans interrup-

tion depuis 1887 et suivis en 1901 par son « Traité de l'immunité » [84, 85, 86, 87, 88].

En même temps que ceux de METCHNIKOFF, et de quelques chercheurs travaillant sous sa direction, de nombreux travaux furent entrepris, apportant de nouveaux arguments à la théorie de l'immunité cellulaire: STCHASNY[111] montra le rôle phagocytaire des cellules géantes dans la tuberculose. DANILEWSKY [27] vit la destruction par les phagocytes des hémogrégarines de la tortue et des hémocytozoaires des oiseaux, WERIGO [120] montra le rôle des globules blancs comme protecteurs du sang; de même EVERARD, DEMOOR et MASSART [32]. MESNIL [79] étudia l'immunité cellulaire chez les vertébrés inférieurs; en particulier, la résistance des poissons et des grenouilles à la bactériémie charbonneuse par la phagocytose. SAWTCHENKO [104] observa la phagocytose du charbon chez les animaux supérieurs. Puis parurent des travaux intéressants sur la phagocytose des stéptocoques par DENYS et LECLEF [29], VAN DE VELDE [119], DENYS et MENNES[30], BORDET[10], MARCHAND[75].

Parallèlement à ceux-ci, d'autres chercheurs s'attachèrent plus spécialement à l'étude des propriétés « chimiotactiques » des leucocytes. Ce terme de « chimiotaxie », créé par PFEFFER, exprime l'attraction ou la répulsion plus ou moins grandes provoquées sur les leucocytes par certaines substances chimiques ou organisées, et, parmi celles-ci, plus particulièrement par les microbes et produits microbiens. L'absence de phagocytose de certaines bactéries virulentes s'expliquerait par leur action chimiotactique négative. Les leucocytes sont capables d'un choix entre des bactéries de virulence et de nature différentes, lorsqu'ils sont en contact avec leur mélange, par suite de cette propriété. La vaccination adapte les leucocytes à se diriger vers des microbes qui les repoussaient à l'état normal. Les premiers travaux importants sur ce sujet furent ceux de MASSART et BORDET en 1890[78], GABRICHEWSKY[37, 38], MASSART[77], BORDET[8], puis ZILBERGER et ZELIONY[131].

En 1895, BORDET faisait connaître sa théorie humorale de l'immunité [7, 11, 12] et cherchait à expliquer la lyse des microbes par l'action de substances dissoutes dans le sérum sanguin. Ces substances, de nature albuminoïde, seraient de deux sortes: l'une, thermolabile, l'*alexine* (ainsi nommée par BÜCHNER) qui existe dans tous les sérums, et qui se trouve par suite dépourvue de spécificité; l'autre, thermostable et spécifique, la *sensibilisatrice*, ainsi appelée parce qu'elle tend à rendre le microbe plus sensible à l'action de l'alexine. Notons de suite que de nombreux synonymes ont été proposés pour désigner ces substances, d'ailleurs inconnues car non isolables, l'*Alexine* de BÜCHNER étant la *cytase* de METCHNIKOFF et le *complément* d'EHRlich; la *Sensibilisatrice* de BORDET étant appelée *Fixateur* par METCHNIKOFF, *Zwischenkörper* (corps intermédiaire) ou *Ambocepteur* par EHRlich, ou encore *Immunisine* ou *Anticorps*. Ces recherches aboutirent à l'énoncé du principe de la déviation du complément de BORDET et GENGOU (14) dont l'application permit à WASSERMANN en particulier d'élaborer une méthode de diagnostic de la syphilis, et qui fut appliquée plus tard à la caractérisation de divers anticorps dans le sérum de malades.

Nous passons sous silence les nombreux travaux postérieurs à ceux de BORDET sur la nature de l'alexine en particulier, et sur la façon dont elle s'unit à la sensibilisatrice pour provoquer la lyse extracellulaire des microbes, ceci sortant du cadre de notre sujet. Mais il est à noter que les découvertes de BORDET furent l'occasion de nouvelles attaques contre la théorie des phagocytes, les contradicteurs de METCHNIKOFF opposant la théorie humorale de l'immunité à sa théorie phagocytaire. Ces deux théories, adverses en apparence, sont d'ailleurs conciliables. La grande importance de l'immunité cellulaire est depuis longtemps admise, elle constitue presque essentiellement l'immunité naturelle. L'immunité humorale se développe considérablement par la vaccination et la sérothérapie

(immunité active ou passive). Ces deux modes de défense de l'organisme agissent alors conjointement, l'un ou l'autre jouant le rôle prépondérant.

Quelques expériences faites avant 1902 sur la phagocytose avaient consisté à mettre en contact les leucocytes d'une part, les éléments phagocytables d'autre part, en dehors de l'organisme, dans des conditions plus définies, mais différant quelque peu des conditions habituellement réunies dans l'être vivant. On avait étudié la phagocytose non plus *in vivo* mais *in vitro*.

A cette époque, en même temps qu'ils émettaient leur théorie des *opsonines*, WRIGHT et DOUGLAS [129] élaboraient une méthode, qui devint d'utilisation pratique, basée sur la phagocytose *in vitro*. Ils avaient remarqué, ainsi que d'autres expérimentateurs avant eux, l'influence favorisante sur la phagocytose des substances contenues dans le sérum sanguin. Ils appelèrent cette action: *opsonisation*. Leur théorie fut la théorie *opsonique* ou des *opsonines*, ces opsonines étant de deux sortes: les *opsonines normales* que contient tout sérum normal, les *opsonines spécifiques* contenues dans le sérum des individus entraînés à la lutte phagocytaire contre un microbe, soit naturellement par l'envahissement de leur organisme par ce microbe, soit artificiellement par la vaccination. Ils créèrent une méthode de mesure du *pouvoir opsonique*, c'est-à-dire du taux de ces opsonines dans un sérum. L'*indice opsonique* est le rapport entre le pouvoir opsonique d'un malade et celui d'un individu sain. Leurs expériences ont été faites tout d'abord avec le staphylocoque. Ils ont appliqué ensuite leur technique à d'autres espèces microbiennes [129, 126, 127, 130, 128].

Leur méthode est la modification du procédé de mesure du pouvoir phagocytaire du sang dû au Major LEISHMAN [61]. Celui-ci mélangeait des volumes égaux d'une suspension bactérienne et de sang obtenu par une piqure au doigt, mesurés dans un tube capillaire; ce mélange était fait sur

une lame et recouvert par une lamelle. Après 15 minutes de séjour à l'étuve à 37°, il enlevait la lamelle et colorait la préparation. Il établissait un rapport, en divisant le nombre de bactéries ingérées par le nombre des phagocytes.

L'originalité de la méthode de WRIGHT et DOUGLAS consiste à opérer dans des tubes capillaires et à décalcifier le sang par une solution de citrate de soude. Le tube capillaire employé est une pipette capillaire ordinaire fermée à son extrémité non effilée au moyen d'une tétine en caoutchouc. Des traits sur le verre permettent de mesurer des volumes égaux : 1° de sang provenant d'une piqure au doigt ; 2° d'une solution de citrate de soude à 1 pour cent dans l'eau physiologique ; 3° d'une suspension bactérienne, les liquides voisins étant séparés par une bulle d'air. La suspension bactérienne est obtenue en émulsionnant dans de l'eau salée une culture de 24 heures, sur gélose. On mélange les liquides en soufflant le tout sur une lame de verre puis en l'aspirant, et ainsi plusieurs fois de suite ; on scelle le tube à la flamme, le maintient 15 minutes à 37°, casse la pointe et fait des étalements sur des lames.

Ceci permet de mesurer le pouvoir phagocytaire du sang total.

Pour étudier le pouvoir phagocytaire des leucocytes isolés, WRIGHT sépare les globules du sérum par agitation avec de l'eau citratée et centrifugation, dans une pipette de forme particulière (125). Trois lavages des globules à l'eau physiologique sont effectués de la même façon. Les leucocytes constituent la couche superficielle des globules déposés.

Le même récipient est utilisé par WRIGHT pour étudier le pouvoir opsonisant d'un sérum. Le sang, obtenu toujours par une piqure au doigt, est introduit dans la pipette où on le laisse coaguler ; on l'agite ensuite avec une solution de citrate de soude et centrifuge.

Cette technique, plus ou moins modifiée, fut appliquée par de nombreux expérimentateurs, JOUSSET [56], STRUBELL [114] et bien d'autres, à la recherche des opsonines spéci-

fiques de diverses maladies. Elle présente cependant des causes d'erreurs dont la principale est l'absence d'un point de comparaison fixe. MAC FARLAND et L'ENGLE [34] ont en effet montré, par l'examen comparé des index opsoniques de nombreux individus sains, que cet index est très variable selon les individus et, chez le même, selon les moments ou les influences extérieures qu'il subit. L'homogénéité plus ou moins grande des émulsions microbiennes, surtout en ce qui concerne le bacille tuberculeux, le degré de concentration de ces émulsions et des émulsions leucocytaires, ont aussi une certaine influence sur la valeur du résultat. Néanmoins, bien des auteurs ont pensé que, malgré ces causes d'erreur, cette méthode avait son intérêt au point de vue du diagnostic et de l'étude de la marche de certaines maladies. Parmi eux, citons: FLEMMING [36], WHITE [121], BUSSE [17], COPELLI [23, 24].

Cette technique est appliquée actuellement surtout à l'évaluation des opsonines spécifiques du staphylocoque (furunculose) du bacille tuberculeux ou du bacille typhique. La pipette spéciale de WRIGHT est abandonnée et les lavages et centrifugations se font dans des tubes à centrifuger ordinaires. De plus, on remplace parfois les leucocytes humains par ceux du cobaye obtenus en provoquant une exsudat péritonéal par une injection d'eau salée ou de bouillon. Une ou deux heures après, on pique et retire quelques centimètres cubes d'exsudat.

Le terme nouveau d'*opsonine*, créé par WRIGHT et DOUGLAS, fut le point de départ de nombreux travaux destinés à connaître leur nature et à voir si ces substances ont une personnalité propre ou bien si l'on peut les identifier avec d'autres déjà connues: alexines ou compléments; sensibilisatrices ou fixateurs.

HEKTOEN et RUEDIGER [50] confirment les résultats obtenus par WRIGHT et supposent la présence dans l'opsonine de deux groupements: un groupement « haptophore ».

thermostable; un groupement « opsoniphore », thermolabile. La chaleur les transformerait en une substance inefficace sur la phagocytose. BULLOCH et ATKIN [15] pensent que la chaleur détruit complètement les opsonines. LÖHLEIN [72] croit aussi qu'elles ne sont identiques ni aux sensibilisatrices ni aux compléments. Au cours de ses recherches sur le mode d'action des opsonines (ou stimulines), LEISHMAN [62] expose qu'il ne croit pas non plus à l'identité de l'opsonine spécifique et de l'immuncorps (fixateur).

D'après DEAN [28], la thermolabilité de l'opsonine des sérums normaux n'est qu'apparente; elle est la conséquence de sa grande dilution; cette opsonine serait en réalité la sensibilisatrice existant dans tout sérum normal.

L'étude de la phagocytose *in vitro* de nombreux microbes montre à GRUBER et FUTAKI [40] que, sauf pour des races très virulentes, la phagocytose est toujours plus intense en présence de sérum non chauffé que en présence de sérum inactivé par chauffage. MUIR et MARTIN [91], sans identifier les opsonines thermolabiles et les alexines, montre qu'il existe entre elles des rapports étroits.

NEUFELD et HÜHNE [93] écrivent que: opsonines normales = alexines, mais ils créent pour les opsonines spécifiques le terme nouveau de *Bactériotropines*. Il fut prouvé peu après que ces deux sortes de substances étaient identiques, et, à partir de cette époque (1907), l'opinion, générale à l'heure actuelle, fut que les opsonines des sérums normaux sont les alexines ou compléments et que les opsonines spécifiques ne sont autres que les sensibilisatrices (fixateurs ou anticorps). Nous pouvons citer: LEVADITI et INMANN [68], LEVADITI et KÆSSLER [69], COWIE et CHAPIN [26], SLEESWIJK [109], HANNEMA [47], BÖHME [6], HATA [48], MEYER [90], SAWTCHENKO et BARIKINE [106, 107, 108], ACHARD et FOIX [1], BÜRGERS et MEISNER [16], WOLRAVENS [124].

Parallèlement à ces recherches d'ordre théorique, toute une série de travaux eurent pour but l'étude de l'influence

sur la phagocytose *in vitro*, non plus des albumines actives des sérums, mais de substances étrangères à l'organisme vivant. Des études furent faites sur les variations dans l'intensité du pouvoir phagocytaire des leucocytes par suite des variations des tensions osmotiques; de la présence de l'ion sodium sous forme de chlorure, bromure, iodure, citrate; des ions calcium, magnésium, etc...; de l'acidité plus ou moins grande du milieu: HAMBURGER et HEKMA [43, 44, 45, 46], HEKMA [49], HAMBURGER et HAAN [41], E. WOLF [122], A. EVANS [31], ACHARD et RAMOND [2]. NOGUSHI [101] montra que la dessiccation du sérum ne supprime pas son pouvoir opsonique et, de plus, que l'alcool empêche la phagocytose, phénomène observé plus tard par G. DI MACCO [73]. L'éther a une action empêchante analogue [GRAHAM, 39]. Les rayons ultra-violets l'augmentent au contraire [IRALA, 53]. Enfin l'action des lipoides: cholestérine, lécithine et leurs éthers, fut étudiée par STRUBER [115] et R. TUNICLIFF [118].

En même temps, d'importants travaux tendaient à résoudre le problème du rapport entre les microbes et les leucocytes. NEUFELD et RIMPAU [94] montraient l'influence favorisante du sérum antipneumococcique sur la phagocytose *in vitro* des pneumocoques, et surtout du sérum anti-streptococcique sur l'englobement des streptocoques. ROSENOW [102] d'une part, TCHISTOWITCH et JUREWITCH [117] d'autre part, observaient la grande résistance à l'englobement manifestée par les pneumocoques virulents.

En 1910, 1911, SAWTCHENKO et BARIKINE [106, 105, 4] essayaient de déterminer le mode d'action de l'alexine et des sensibilisatrices, à propos de la phagocytose de globules rouges sensibilisés. Ils firent une étude approfondie du phénomène d'accolement précédant l'englobement des globules rouges par les leucocytes. Semblable étude était poursuivie en même temps par LEVADITI et MUTERMILCH [67] à propos de la phagocytose des trypanosomes du Nagana.

En 1910 aussi, NEUFELD [92] proposa, pour le titrage du sérum antiméningococcique, une méthode basée sur la phagocytose *in vitro*, en dosant les « tropines » ou opsonines de ce sérum. Rappelons brièvement cette méthode dont nous avons retenu certaines particularités pour l'élaboration de notre technique. Il emploie des leucocytes obtenus en injectant dans le péritoine d'un cobaye du bouillon chargé d'aleurionate et en le sacrifiant le lendemain. Il lave la cavité péritonéale plusieurs fois avec de l'eau physiologique puis centrifuge le liquide trouble ainsi obtenu. Il émulsionne les leucocytes dans de l'eau physiologique.

L'émulsion bactérienne est préparée à partir d'une culture de méningocoque bien développée, de 20 heures, sur gélose, et d'un liquide émulsionnant constitué par un mélange à parties égales de bouillon et d'eau physiologique. Ces émulsions sont très concentrées.

Il ajoute, dans de petits tubes, aux dilutions du sérum à titrer, 1 goutte d'émulsion bactérienne et 2 gouttes d'émulsion leucocytaire, au moyen d'une pipette comptant 20 gouttes au centimètre cube. Après 1 h. 1/2 de contact à 37°, il fait des frottis très minces, fixe à l'alcool-éther et colore au bleu de méthylène.

La méthode d'obtention des leucocytes est classique; les points intéressants à retenir sont: la concentration très grande de l'émulsion microbienne et le mode de mise en contact des deux éléments.

STROUSE [113] appliqua la technique de NEUFELD à l'étude des opsonines spécifiques des sérums antipneumococciques.

LISTER, en 1914 [70] appliqua la technique de WRIGHT à une étude de la phagocytose des pneumocoques.

Quelques savants étudièrent les relations entre la température et la vitesse de la phagocytose: LEDINGHAM [60], KITE et WHERRY [57], MADSEN et WULFF [74], puis, en 1917, COMANDON [20] qui, au sujet de la phagocytose des hématozoaires du calfat, appliqua à son étude la méthode de l'enregistrement cinématographique qu'il avait déjà préco-

nisée en 1913 [22] et qu'il appliqua en 1920 [21] à l'étude de l'accélération des mouvements des leucocytes sous l'influence d'une élévation de température de 0° jusqu'à 37°, température du corps humain.

En 1919, LEVADITI [66], à propos de l'action leucotoxique des streptocoques des plaies de guerre, étudia le mécanisme du phénomène phagocytaire, dans lequel il distingua 4 phases: attachement du microbe au leucocyte; englobement; activité intraleucocytaire du microbe; sécrétion de leucotoxine amenant parfois la mort du leucocyte; enfin digestion intracellulaire. La phase d'accolement fut aussi étudiée récemment par LE FÈVRE DE ARRIC [63, 64].

Citons aussi les récents travaux de MÉTALNIKOW sur l'immunité chez les chenilles des abeilles, *galleria mellonella* [80, 81, 83] et sur le rôle des quatre grosses cellules phagocytaires de l'*ascaris megalocephala* [82].

M. NICOLLE et CÉSARI publièrent en 1922 [96] un mémoire très intéressant sur la phagocytose en général, dont nous citons les dernières phrases puisqu'elles sont le point de départ de notre travail: « Le raccord des expériences *in vitro* et des observations *in vivo* nécessitera l'élaboration de nouvelles techniques. Celles-ci devront être simples, rapides et bien comparables, afin de permettre des recherches très nombreuses et suffisamment précises. On saura alors jusqu'à quel point la phagocytose, hors de l'organisme, renseigne sur la résistance des animaux et, du même coup, sur la virulence des germes. Nous nous efforçons actuellement de trouver de telles méthodes, convaincus de l'importance des résultats qu'elles fourniront dans la solution des deux problèmes précédents et, aussi, dans le titrage des sérums antimicrobiens. »

Les techniques élaborées jusqu'ici ne réunissent pas les desiderata exposés. Celle de WRIGHT, plus ou moins modifiée, est toujours destinée à étudier le pouvoir phagocytaire des leucocytes sur des microbes donnés, éléments invariables, en présence de sérums variés. Or, si l'on veut étu-

dier les microbes au point de vue de leur phagocytabilité *in vitro*, les leucocytes sont encore l'élément invariable mais contre lequel se heurteront des éléments variés: les microbes. La technique de NEUFELD réalise aussi cette condition au point de vue leucocytaire. Nous nous en sommes inspirés ainsi que de sa méthode de mélange des émulsions très concentrées. Nous verrons que notre méthode s'en éloigne par d'autres points.

La détermination de la phagocytabilité d'un germe microbien, dans des conditions déterminées, donnant des résultats comparables, est intéressante indépendamment de toute relation pouvant exister entre ce caractère et d'autres possédés par ce même germe. « Chaque microbe se définit », ont dit M. NICOLLE et CÉSARI [98], « par un certain nombre de caractères judicieusement choisis ». Ces caractères ont été classés par eux en trois groupes principaux: *caractères généraux*: morphologie, caractères des cultures, caractères biologiques; *pouvoir pathogène*: faculté toxigène et virulence; *caractères antigènes*, ceux-ci de trois sortes: Toxines, Enzymes, Antigènes « indifférents ». C'est parmi ces derniers que l'on place les antigènes actifs dans les réactions d'agglutination, de précipitation, de fixation (méthode Bordet-Gengou), de bactéricidie, de phagocytose *in vitro*. Ce dernier caractère a donc son importance, au même titre que les autres, dont la détermination est devenue classique. Il fait partie d'un ensemble dans lequel il joue son rôle et sa connaissance peut être utile pour le diagnostic d'un microbe donné.

Il y a, de plus, un certain intérêt à étudier le rapport entre la virulence et la phagocytabilité *in vitro* d'un même microbe, les auteurs n'étant pas toujours d'accord sur le sens de ce rapport. L'intérêt du problème n'est pas purement théorique. Il serait intéressant de pouvoir déterminer exactement ce rapport; la connaissance expérimentale de l'une des propriétés d'un microbe entraînerait ainsi la connaissance de l'autre, par simple déduction. Si la détermi-

nation de la phagocytabilité *in vitro* devenait une opération simple, rapide et précise, elle pourrait en quelque sorte suppléer à celle de la virulence. Or nous savons que la détermination de la virulence est une opération à assez longue échéance; quelques jours, tout au moins, sont nécessaires pour obtenir un résultat. De plus, les méthodes courantes d'inoculation aux animaux de laboratoire (souris, cobaye, lapin) comportent toujours un élément, l'animal, dont la fixité comme réactif ne saurait être absolue, la sensibilité propre de chaque individu étant assez variable. La phagocytose *in vitro* pourrait tout au moins donner une première indication relativement rapide, et par là même précieuse parfois (cf l'épreuve de la bile de Neufeld, pour le pneumocoque).

Un autre point, signalé, nous l'avons vu, par M. NICOLLE et CÉSARI est celui du titrage des sérums antimicrobiens. Ils ont insisté sur ce fait dans leurs « Remarques sur le titrage des Sérums thérapeutiques » [97]. Les sérums antimicrobiens se titrent, soit *in vivo* (il est alors nécessaire que les microbes soient virulents), soit *in vitro*, les méthodes employées à cet effet étant: l'agglutination, la précipitation, la déviation du complément et la bactéricidie. Or ces méthodes ne donnent pas de résultats très satisfaisants dans le cas de certains sérums; le sérum antipneumococcique est parmi ceux-ci: son pouvoir agglutinant et son pouvoir précipitant ne marchent pas de pair avec son pouvoir préventif vis-à-vis de la souris, le pouvoir déviant n'est pas titrable parce qu'il est trop faible et que l'échelle de mesure est trop réduite, enfin le pouvoir bactéricide ne peut être apprécié facilement pour des raisons de technique. Une méthode simple, rapide et donnant des résultats comparables, de phagocytose *in vitro*, permettrait tout d'abord d'étudier le pouvoir favorisant de certains sérums sur l'englobement des microbes homologues par les phagocytes et pourrait devenir une nouvelle méthode de titrage *in vitro* de certains sérums antimicrobiens. Nous avons vu que

NEUFELD a tenté de résoudre la question au sujet du sérum antiméningococcique.

Malgré tout l'intérêt qu'elle présente, cette partie n'a pu être qu'ébauchée, par suite des difficultés rencontrées et surtout à cause du temps considérable qu'il serait nécessaire de consacrer à ces recherches.

Notre travail n'est que la suite et la conséquence des recherches entreprises depuis quelques années par M. NICOLLE et CÉSARI. Nous nous faisons un agréable devoir de les remercier ici, non seulement de nous avoir dirigée dans notre travail par leurs judicieux conseils, mais encore de nous avoir fait profiter, en même temps que de leur expérience, des résultats intéressants qu'ils avaient déjà obtenus, en particulier au sujet de l'élaboration de la technique.

Le plan naturel de ce travail sera :

CHAPITRE I. — TECHNIQUE.

CHAPITRE II. — EXPÉRIENCES DE PHAGOCYTOSE IN VITRO
DE DIVERSES ESPÈCES MICROBIENNES. —
EXPOSÉS PARTIELS DES RÉSULTATS OB-
TENUS.

CHAPITRE III. — EXPOSÉ GÉNÉRAL DES RÉSULTATS. LEUR
INTERPRÉTATION.

CONCLUSIONS.

BIBLIOGRAPHIE.

CHAPITRE I

TECHNIQUE

La technique que nous avons adoptée est inspirée de celle de NEUFELD [92] que nous avons décrite dans la première partie de ce travail.

Nous indiquerons, en même temps que la technique définitive à laquelle nous nous sommes arrêtée, les modifications que nous lui avons fait subir au cours de nos expériences.

Le problème consiste à mettre en présence, d'une part des leucocytes, d'autre part des microbes, les uns et les autres sous forme d'émulsions dans un milieu convenable, et à observer, après un temps de contact plus ou moins long, l'intensité du phénomène phagocytaire.

Nous allons voir successivement comment préparer les émulsions leucocytaires et microbiennes, de quelle façon les mettre en contact et dans quelles conditions, et enfin comment observer et comparer les résultats de cette lutte.

1° PREPARATION DES EMULSIONS

- a) Emulsions leucocytaires.
- b) Emulsions microbiennes.

a) Emulsions leucocytaires

Nous avons adopté, d'une manière générale, les leucocytes de cobaye que l'on obtient facilement en provoquant chez cet animal un afflux de leucocytes dans le péritoine. Nous

verrons plus loin que nous avons parfois remplacé ces leucocytes par ceux de lapin ou de cheval.

En 1896, VAN DE VELDE [119] expérimenta avec des globules blancs obtenus « par une injection de staphylocoques morts dans la plèvre d'un lapin et séparés de la partie liquide de l'exsudat par l'action de la force centrifuge ». Ce même procédé fut, deux ans plus tard, celui de MARCHAND [75] dans ses expériences sur la phagocytose *in vitro* des streptocoques.

D'autre part, en 1896 aussi, BORDET [8] vit qu'on obtient facilement un exsudat en injectant dans la cavité péritonéale d'un cobaye, non plus des microbes tués, mais quelques centimètres cubes de bouillon peptonisé, observation déjà faite en 1894 par ISSAEFF [52].

METCHNIKOFF nota en 1905, dans son « Traité de l'Immunité [88] que « lorsqu'on injecte dans le péritoine des cobayes un liquide étranger, capable d'exciter l'action phagocytaire, comme le bouillon de veau, l'eau physiologique, l'urine, etc..., on provoque d'abord une phagolyse passagère. Mais à ce stade un autre succède dans lequel les leucocytes deviennent très nombreux ».

En 1902, TARASSEVITCH [116] injecta dans la cavité pleurale du lapin une solution d'aleurone à la dose de 5 % dans du bouillon, solution qu'il remplaça parfois par de la gluten-caséine. LÖHLEIN [71] injecta simplement quelques centimètres cubes de bouillon dans la cavité péritonéale du cobaye pour obtenir un exsudat assez abondant après 5 ou 8 heures.

Une solution d'aleuronate fut choisie par SAWTCHENKO [106] pour ses recherches sur la phagocytose des globules rouges et par NEUFELD [92] dans sa méthode de titrage des « tropines » méningococciques. KORSCHUN [58] employa indifféremment glutéo-caséine ou Mellinsfood (farine lactée à l'usage de l'alimentation des enfants).

Nous-même avons remplacé la solution d'aleurone primitivement utilisée par une émulsion de farine lactée: une

ose de farine lactée pour 10 cc. de bouillon Martin simple.

Une vingtaine d'heures après l'injection, le cobaye ainsi « préparé » est sacrifié, après avoir subi une ponction cardiaque destinée à fournir du sérum frais dont nous verrons plus loin l'usage.

Il est à remarquer que la majeure partie des globules blancs constituant ces exsudats sont des polynucléaires; les mononucléaires n'y existent qu'en faible proportion; cette proportion est beaucoup plus forte lorsqu'on sacrifie le cobaye 48 heures après l'injection préparante.

On fixe le cobaye mort sur un plateau, on débride largement la peau de l'abdomen et on fait une boutonnière au péritoine. Par cette ouverture, on introduit, au moyen d'une pipette à boule, 20 cc. environ d'eau citratée stérile dont la formule est la suivante:

Citrate de soude.....	12
Chlorure de sodium.....	5
Eau distillée q.s.p.	1000

On maintient fermée la boutonnière au moyen d'une pince et incline le cobaye dans tous les sens pour obtenir par cette sorte de massage un mélange intime entre la liqueur citratée et l'exsudat épais dans lequel baignent les anses intestinales. Le liquide opalin ainsi obtenu, émulsion plus ou moins homogène, est aspiré avec la pipette à boule et réparti dans des tubes à centrifuger. On centrifuge pendant 2 minutes à une vitesse modérée.

Dans ces conditions, les leucocytes ne sont pas altérés, sans qu'il soit nécessaire de maintenir la température à 38° pendant la durée de la centrifugation, comme le fait SALIMBENI [103]. Maints expérimentateurs ont démontré que quelques centrifugations et lavages successifs à l'eau salée n'altèrent pas les leucocytes, ceux-ci sont seulement engourdis mais récupèrent leur activité par le repos: LAMBOTTE et STIÉNNON [59], KORSCHUN [58], SAWTCHENKO [105, 106], ACHARD et RAMOND [2].

On décante le liquide clair et émulsionne le culot de globules blancs soit dans de l'eau physiologique (solution de chlorure de sodium à 9 pour 1000), soit dans du sérum frais de cobaye, pur ou plus ou moins dilué avec de l'eau physiologique. On obtient ce sérum de la façon suivante: On fait au cobaye une ponction intracardiaque en observant les précautions d'usage: immobilisation de l'animal, aseptie de la région sternale, lavage de la seringue, préalablement stérilisée, avec de l'eau salée, pour éviter le laquage du sang. On recueille ainsi 10 à 20 cc. de sang. La coagulation en est obtenue par un repos de 5 à 10 minutes dans un tube à centrifuger. On centrifuge alors pendant 5 minutes, décante le sérum au moyen d'une pipette à boule et fait les dilutions convenables.

Nous avons presque toujours utilisé le sérum du cobaye « préparé » au point de vue leucocytaire, la ponction du cœur étant pratiquée juste avant de le sacrifier. Mais notre expérience personnelle nous permet d'affirmer que, au point de vue de l'action opsonisante de ce sérum, il est indifférent de le prélever, soit sur l'animal fournisseur des leucocytes, soit sur un cobaye « neuf ». Cette opération est inoffensive lorsque la quantité de sang prélevée ne dépasse pas 10 cc. pour un cobaye adulte.

Nous avons indiqué au début de ce chapitre que les leucocytes du cobaye ont été parfois remplacés par ceux du lapin, la formation d'un exsudat pleural étant obtenue par le même procédé que celle de l'exsudat péritonéal chez le cobaye: injection, dans la cavité pleurale, de bouillon additionnée de farine lactée, 24 heures avant l'expérience de phagocytose. Cette légère modification de technique est imposée par le fait que les parois péritonéales sont très absorbantes. chez le lapin.

Nous avons fait aussi quelques expériences de phagocytose avec des globules blancs de cheval, obtenus de la façon suivante: Dans un flacon marqué d'un trait de repère à 200 cc., on verse 50 cc. de la solution citratée stérilisée

dont nous avons vu plus haut la formule. On remplit avec du sang de cheval jusqu'au trait 200, on laisse sédimenter pendant 2 heures, recueille le plasma qui surmonte les globules, centrifuge, lave le dépôt à l'eau physiologique et le remet en suspension dans du sérum frais du même cheval.

La numération des leucocytes, faite dans les premières expériences avec l'hématimètre de Thomas-Zeiss, fut remplacée ensuite par l'évaluation de l'opacité de l'émulsion comparativement à un étalon néphélométrique analogue au « Nephelometer » de MAC FARLAND [33]. C'est un tube scellé contenant une suspension de sulfate de Baryum dont l'opacité est la même que celle d'une émulsion contenant environ 350.000 leucocytes au millimètre cube. En général, on obtient semblable émulsion en ajoutant aux globules un volume de liquide égal à la moitié du volume occupé par l'exsudat additionné des 20 cc. d'eau citratée employée pour le recueillir (émulsion double).

Il est à remarquer que nous expérimentons avec des leucocytes non lavés; mais nous verrons plus loin qu'il n'est pas nécessaire de les priver totalement de la faible quantité de complément qui les imprègne, puisque nous serons obligés d'en ajouter, à des doses importantes dans la plupart des cas, pour obtenir des phagocytoses notables. C'est ce complément que nous ajoutons sous forme de sérum frais de cobaye plus ou moins dilué dans lequel les leucocytes sont émulsionnés.

b) Emulsions microbiennes

Les expériences de phagocytose sont faites avec des cultures de 24 heures, les milieux de culture variant suivant les microbes envisagés.

Lorsque ce milieu est liquide (ceci est le cas de la plupart des microbes que nous avons étudiés) on centrifuge la culture pendant 10 minutes; on décante le liquide et on

émulsionne le culot de centrifugation dans de l'eau salée à 9 pour 1.000.

Lorsque le milieu de culture est solide, on prélève les colonies au moyen d'une auge de platine et les émulsionne directement dans l'eau physiologique.

Dans le cas particulier du bacille tuberculeux, il est difficile d'obtenir des émulsions homogènes; on y parvient néanmoins en broyant les bacilles dans un petit mortier, et en émulsionnant, en versant **goutte à goutte, tout en** continuant le broyage, de l'eau physiologique à l'aide d'une pipette effilée. On agite ensuite cette émulsion dans un flacon stérile avec des perles de verre (CALMETTE, BOQUET, NÈGRE, 18).

On fait des émulsions d'opacités semblables, leur volume étant en général le quart, le tiers ou la moitié du volume des cultures en milieu liquide, suivant la richesse en microbes de ces cultures.

Dans tous les cas, les expériences ont été faites avec des microbes vivants, non chauffés.

Nous avons titré la virulence des microbes étudiés par les méthodes usuelles d'inoculation aux animaux: injection sous-cutanée à la souris pour les pneumocoques, titrage sur le lapin pour les streptocoques, etc. Nous indiquerons pour chaque espèce microbienne le mode de titrage ainsi que la virulence des échantillons mis en expérience.

2° MISE EN CONTACT DES EMULSIONS

Les deux émulsions, microbienne dans l'eau physiologique, leucocytaire dans l'eau physiologique ou dans le sérum frais de cobaye pur ou dilué, sont mises en contact dans de petits tubes de 5 à 7 millimètres de diamètre et de 6 à 8 cm. de longueur.

On mesure, dans chaque tube, 2 gouttes de chacune des deux émulsions. Ces mesures sont faites au moyen de

pipettes compte-gouttes donnant 20 gouttes au gramme, préalablement stérilisées.

On secoue légèrement pour mélanger les liquides et abandonne au repos à la température convenable. C'est un fait reconnu depuis longtemps que les mouvements améboïdes des leucocytes sont accélérés par l'élévation de la température: JOLLY [55], COMANDON [21], WALLACE O. FENN [35]. Il est de toute évidence que plus la vitesse des mouvements des leucocytes est grande, plus leurs chances de se rapprocher des microbes pour les englober sont augmentées. MADSEN et WULFF [74] ont observé en effet que « le pouvoir phagocytaire augmente avec la température, en partant d'environ 5°, jusqu'à un maximum qui correspond exactement à la température de l'individu dont proviennent les globules blancs ». Ce maximum est donc 37° pour l'homme, 39° pour le cobaye.

LEDINGHAM [60], en 1908, ayant remarqué que si l'on met en contact des cocci, des leucocytes et du sérum frais (opsonines: sensibilisatrices normales et complément), la phagocytose est 4 ou 5 fois moins intense à 18° qu'à 37°, mais que, d'autre part, si les cocci et le sérum frais ont été en contact pendant un certain temps avant d'ajouter les leucocytes, la phagocytose est aussi intense à 18° qu'à 37°, conclut que la température agit sur la rapidité de fixation des opsonines sur les microbes.

Il est indifférent que pendant l'opsonisation des microbes par le sérum normal, la température soit plus ou moins élevée, à la condition qu'elle ne s'abaisse pas au-dessous de 11° d'après KITE et WHERRY [57]. Quoi qu'il en soit, nous avons pu constater que l'élévation de température a toujours une influence favorisante sur la phagocytose. Nous avons donc choisi, pour nos expériences, des températures différentes suivant que les microbes étudiés étaient peu ou très phagocytiques. C'est ainsi que 37° sont nécessaires pour que les pneumocoques virulents soient englobés par les leucocytes, que 30° suffisent pour les streptocoques,

que le Rouget virulent est très phagocyté à 25° et que, pour les bacilles tuberculeux, nous avons observé des phagocytoses marquées à 6 ou 8°.

Nous avons prolongé plus ou moins la durée du temps de contact suivant la phagocytabilité des espèces microbiennes. Nous avons observé le phénomène en général après un quart d'heure de séjour à la température choisie; puis des séries de tubes ont permis de le suivre de quart d'heure en quart d'heure jusqu'à une heure en général, parfois une heure et demie.

BÖHME, en 1908 [6] observa que l'agitation du tube contenant des leucocytes, des bacilles typhiques et un sérum opsonisant, pendant son séjour à 38° (d'une durée de 8 minutes), activait sensiblement la phagocytose. Cependant COURMONT et DUFOUT [25] ont montré que par l'agitation de sérum frais de cobaye à 37°, pendant un temps beaucoup plus long il est vrai (de 2 à 5 heures), on détruisait le complément que contenait ce sérum, celui-ci pouvant être ensuite réactivé par l'addition de faibles doses de complément. Cette inactivation était plus rapide dans l'oxygène que dans l'air, nulle ou faible dans l'azote ou dans le vide: on se trouvait donc en présence d'un phénomène d'oxydation. C'est aussi l'opinion de M. et MARG. JACOBY (54). Or nous verrons l'importance du rôle favorisant joué par le complément dans la phagocytose « *in vitro* ». D'autre part, ARKIN [3] a vu que certains corps oxydants, comme l'iodoxybenzoate de sodium (qui contient 11,43 pour 100 d'oxygène actif) favorisent la phagocytose *in vitro* du streptocoque et du staphylocoque par des leucocytes humains en présence de sérum humain; au contraire, un réducteur, tel que le cyanure de potassium, diminue cette phagocytose. Il conclut donc que l'oxydation active l'action des opsonines. Il fut bien observé plus récemment, en 1916, par SPADOLINI [110] que les propriétés spécifiques des sérums étaient détruites par l'oxydation résultante de l'agitation, mais après un temps assez long et toujours plus lentement que

le complément. Ces deux phénomènes peuvent se compenser et leur résultante se trouvera favoriser ou contrarier la phagocytose *in vitro* suivant que l'un ou l'autre, destruction du complément ou activation des propriétés opsonisantes des sérums, sera prépondérant. L'agitation doit naturellement faciliter la phagocytose en favorisant, tout au moins au début, le contact entre les leucocytes et les microbes. Cependant, si certains observateurs, tels KITE et WHERRY [57] ont pensé, sans le prouver d'ailleurs, que l'agitation facilitait l'englobement des microbes, de nombreuses expériences inédites faites par M. CÉSARI sur divers échantillons de pneumocoques ne lui ont pas permis d'observer de différence entre les résultats obtenus par agitation et ceux obtenus par simple séjour à l'étuve. Une série de ces essais ont été faits en agitant les tubes pendant cinq minutes avant de les mettre à l'étuve et de nouveau, autant de temps, après les en avoir retirés. Plus tard, les tubes furent disposés dans un bain-marie chauffé à la température de 37° où ils étaient agités mécaniquement pendant toute la durée de l'expérience.

Nous avons donc abandonné cette technique et avons toujours opéré par séjour au repos à la température choisie.

3° PREPARATION — COLORATION DES FROTTIS

Lorsque les tubes sont demeurés à l'étuve pendant le temps convenable, on décante le liquide qui surmonte les leucocytes, en les renversant dans une boîte de Pétri; les leucocytes restent collés fortement aux parois. On a préparé des pipettes effilées stérilisées, ainsi que des lames bien propres sur lesquelles on a pu graver les indications nécessaires pour reconnaître les préparations au moment où on les examinera.

On promène la pointe effilée d'une de ces pipettes dans le fond du tube: les leucocytes y montent par capillarité. On souffle la goutte ainsi recueillie, sur une lame; on l'étale

avec l'extrémité de la pipette posée à plat et laisse sécher à l'air.

Le fixateur utilisé est l'alcool-éther, le passage dans la flamme risquant de déformer les leucocytes, plus fragiles que des microbes.

On coore à la thionine phéniquée. La formule de ce colorant, due à M. NICOLLE, est la suivante:

Thionine	0 gr. 50
Alcool absolu.....	10 cc.
Acide phénique cristallisé....	3 gr.

Triturer et laisser dissoudre 24 heures dans un flacon, puis ajouter:

Eau distillée.....	90 cc.
--------------------	--------

et filtrer (Les colorations sont meilleures avec les solutions vieilles d'au moins 3 semaines).

On prolonge le contact de la préparation avec le colorant 6 à 8 minutes. On lave à l'eau distillée. Le protoplasme des leucocytes est coloré en bleu pâle, leurs noyaux en bleu plus foncé; les microbes, bleu intense, se détachent très nettement sur le fond clair des leucocytes dont les contours sont cependant très visibles.

Pour le bacille tuberculeux, il est nécessaire de modifier la technique de coloration et de remplacer la thionine phéniquée par la fuchsine de Ziehl avec coloration du fond au bleu de méthylène.

Ces préparations se conservent bien, ce qui permet des comparaisons entre les résultats obtenus dans des expériences faites à des dates assez éloignées.

4° FIGURATION DES RESULTATS

On examine les préparations au microscope dans toutes leurs parties. On note le rapport qui existe entre le nombre des microbes libres et celui des microbes phagocytés, la proportion des leucocytes vides et de ceux qui ont englobés les microbes en plus ou moins grand nombre.

Nous appellerons leucocytes *bourrés* ceux qui contiennent un nombre de microbes tel que leur protoplasme en est à peu près couvert. On peut ainsi compter jusqu'à 15 à 20 pneumocoques par leucocytes, 20 à 30 streptocoques par exemple.

La numération de tous les leucocytes d'une part, des phagocytes d'autre part, destinée à établir un rapport mathématique entre ces deux nombres, telle qu'elle est faite pour la détermination du pouvoir opsonique par la méthode de WRIGHT, est une opération longue et fastidieuse. De plus, les leucocytes étant dans nos expériences des réactifs invariables lorsque les conditions sont les mêmes, il est au moins aussi intéressant de noter le rapport existant entre le nombre des microbes inclus dans les phagocytes et le nombre des microbes libres. Une numération de ces microbes serait impossible.

Voici le mode de figuration des résultats que nous avons adopté. Il permet des comparaisons rapides. Avec un peu d'habitude, on distingue facilement les degrés dans le phénomène et on peut classer le stade observé dans l'une ou l'autre case du tableau. L'opération est facilitée lorsque l'on peut comparer l'image de phagocytose d'un microbe avec celle d'un autre échantillon de la même espèce microbienne, de virulence et de phagocytabilité *in vitro* connues, dans les mêmes conditions d'expérience:

- ni accollement, ni phagocytose; tous les microbes libres..... 0
- accollement mais pas de microbe inclus dans les leucocytes..... —
- début faible de phagocytose: quelques leucocytes contenant de 2 à 4 microbes..... +
- Phagocytose nette bien que peu marquée: la moitié des leucocytes contenant de 2 à 10 microbes; rares leucocytes bourrés; au moins la moitié des microbes libres.. ++

- Phagocytose marquée: 2 à 10 microbes dans
presque tous les leucocytes; beaucoup de
leucocytes bourrés; encore 1/3 des mi-
crobes libres..... + + +
 - Phagocytose intense, peu de microbes libres. + + + +
 - Phagocytose totale; tous les microbes inclus
dans les leucocytes..... + + + + +
-

CHAPITRE II

EXPERIENCES DE PHAGOCYTOSE IN VITRO DE DIVERSES ESPECES MICROBIENNES. EXPOSES PARTIELS DES RESULTATS

Nous avons appliqué notre technique à l'étude de la phagocytabilité in vitro des espèces microbiennes suivantes:

- 1° Pneumocoque
 - 2° Streptocoque
 - 3° Rouget
 - 4° Charbon
 - 5° Pneumobacille de Friedländer
 - 6° Paratyphique B
 - 7° Bacille tuberculeux
 - 8° Gonocoque
-

1° Pneumocoque

La virulence des échantillons étudiés a été titrée sur la souris par inoculation sous la peau du dos.

Echantillons		Groupe	Titrage sur la souris	Solubilité dans la bile
avirulents	A	II	0	insoluble
—	P6	IV	0	id.
—	K24	IV	0	id.
très peu virulent.	Nutmänn.		10 ⁻¹	soluble
virulents	Laroche	I	10 ⁻² (1)	id.

—	<i>Denis</i>	II	10^{-3}	id.
—	<i>Gaillardon</i> ...	III	10^{-4}	id.
	<i>très virulent. Griffith</i>	II	10^{-1}	id.

(1) Nota: 10^{-3} cc. = $\frac{1}{10^3}$ cc. = $\frac{1}{1.000}$ cm. cubes.

Les expériences ont été faites avec des cultures de 24 heures, cultures petites-filles à partir du milieu de conservation. La méthode de conservation était celle adoptée au laboratoire de M. NICOLLE (COTONI, TRUCHE et RAPHAEL: 24 bis): on introduit quelques centim. cubes de la culture à conserver dans un tube de gélatine T qu'on a fait fondre à 37°, de telle façon que, pour deux parties de gélatine, il y ait une partie de culture. On secoue légèrement de manière à obtenir un mélange homogène des deux liquides, scelle le tube et le conserve à la glacière. Deux jours avant la date prévue pour une expérience, on ouvre le tube, après avoir fait fondre la gélatine à 37°, et ensemence largement en milieu T (culture fille); 24 heures plus tard, la culture étant en général abondante, on la réensemence dans le milieu choisi pour l'expérience.

Au cours de nos recherches, nous avons modifié comme suit ce procédé de conservation des pneumocoques: les microbes à conserver sont ensemencés dans du bouillon Martin additionné de sérum de lapin dans la proportion de 1 partie de sérum pour 2 parties de gélatine T préalablement fondue à 37°. Conservation et repiquage se font ensuite de la même manière que précédemment.

Les cultures petites filles ont été faites dans des milieux variés:

- milieu T.
- bouillon Martin simple.
- Sérum pur de lapin.

— Bouillon Martin simple, additionné de $\frac{1}{10}$ de son volume de sérum normal de cheval.

— Bouillon Martin simple additionné de $\frac{1}{10}$, $\frac{1}{100}$ ou $\frac{1}{1000}$

de son volume de sérum antipneumococcique. On réalise dans ces derniers cas une sensibilisation à l'état naissant, en soumettant, dès leur formation, les pneumocoques à l'action opsonisante soit des sensibilisatrices normales, soit des sensibilisatrices spécifiques. Le sérum antipneumococcique utilisé (voir l'exp. III) était spécifique du groupe II des pneumocoques.

Le phénomène a été observé après une demi-heure, 1 heure et 1 heure et demie de séjour à l'étuve à 37°. Son intensité était en général maxima après 1 heure, tandis que, si le séjour à 37° se prolongeait davantage, l'observation devenait plus difficile par suite de la multiplication notable des microbes à cette température.

Nous avons réuni à la fin de ce chapitre les expériences les plus caractéristiques. Nous allons essayer de grouper les résultats ainsi obtenus.

Nous avons déjà indiqué que nos expériences ne comportent que l'observation des deux premières phases de la phagocytose: accolement, attachement du microbe au leucocyte; puis englobement du microbe par le phagocyte; sans nous préoccuper du sort des deux adversaires: mort du leucocyte tué par les toxines microbiennes (leucocidines), ou digestion intracellulaire du microbe grâce aux ferments protéolytiques sécrétés par le leucocyte. Nous voulons tout d'abord insister sur la première phase de la phagocytose, ce phénomène d'acculement déjà observé par METCHNIKOFF lorsqu'il fit englober des hématies d'oie par des globules blancs dans le péritoine du cobaye: « Les macrophages poussent de tout petits prolongements protoplasmiques et les fixent sur la paroi des hématies. Il s'ensuit un *accolement* des macrophages de cobaye avec les globules rouges d'oie... cet accolement avec de tout petits pseudopodes est le début de l'englobement des hématies par les macro-

phages » [88]. *In vitro* cette fois, LÖHLEIN [71] vit que des vibrions cholériques, mis en présence de leucocytes, se rapprochent de ces cellules et « restent parfois comme collés au protoplasme d'un leucocyte ». SAWTCHENKO [106, 108] mit ce phénomène d'accolement en évidence en allongeant cette première phase par différents artifices ayant pour but, soit d'empêcher l'englobement, soit seulement de le retarder. En refroidissant, par exemple, des leucocytes de cobaye mis en présence d'hématies de mouton « sensibilisées » (par un sérum de lapin « antimouton »), il vit que les leucocytes immobilisés par le froid étaient complètement entourés d'hématies collés à leur surface. Des résultats identiques furent obtenus dans des expériences analogues par M. NICOLLE et CÉSARI [96]. Il y a coagglutination de la surface des globules rouges sensibilisés avec celle des phagocytes; phénomène d'adhésion, d'humectation de la surface de l'objet de la phagocytose par le leucocyte, de corrélation de tensions superficielles, donc phénomène d'ordre physico-chimique. On peut constater le même phénomène avec des leucocytes tués (par chauffage à 50° pendant une heure). BARIKINE [4] montra que des hématies peuvent s'accoler à des leucocytes, eux-mêmes adhérents à des plaques de verre, et plus fortement si les hématies ont été sensibilisées. Ce qui est vrai pour l'englobement des hématies l'est aussi pour celui des microbes; il l'est également pour la phagocytose des trypanosomes du Nagana par les leucocytes du cobaye; voici, à ce sujet, les conclusions de LEVADITI et MUTERMILCH [67]: « Le phénomène de la phagocytose comporte 2 phases: la première, celle de l'attachement de l'objet phagocytable sur le leucocyte; la seconde, celle de l'englobement proprement dit et de la destruction du trypanosome. »

L'action des sérums opsonisants (normaux ou spécifiques) se manifesterait par une modification chimique des surfaces telle que l'adhérence entre microbes et leucocytes est augmentée. Selon LE FÈVRE DE ARRIC [63, 64], les extraits

leucocytaires abandonneraient leur principe adhésif au noir animal sur lequel les microbes se fixeraient ensuite.

Nous avons, pour notre part, constamment saisi cette phase d'accrolement, plus visible lorsque les microbes étudiés étaient peu phagocytés: La rapidité de l'englobement des microbes très phagocytés étant très grande, on les trouve très vite dans les phagocytes et non plus seulement accolés à leurs parois. On peut cependant toujours voir des microbes accolés avant l'englobement, sauf lorsque la phagocytose est totale, ce qui est rarement immédiat. Mais l'accrolement est particulièrement bien visible, après un temps de contact faible, pour les microbes peu phagocytés.

Nous parlons ici des microbes en général et non pas seulement des pneumocoques, nous nous abstenons donc de redites lorsque nous parlerons des autres espèces microbiennes étudiées.

Non seulement cette phase de contact adhésif, phase plus ou moins saisissable suivant la rapidité de l'acte phagocytaire, est un phénomène d'ordre général précédant toujours l'englobement, mais nous l'avons toujours observée même dans le cas de microbes que nous n'avons jamais pu voir phagocytés par la suite. C'est ainsi que, dans le cas d'un échantillon de bactériidie charbonneuse ainsi que d'un pneumobacille très virulent (n° 16), déjà après un quart d'heure de contact, on pouvait voir des bacilles adhérant à la paroi des leucocytes; après 1 heure, le nombre de ces bacilles accolés avait sensiblement augmenté, sans qu'un seul d'entre eux ait pénétré à l'intérieur d'un leucocyte.

Il est intéressant de noter que l'accrolement est en général plus marqué pour les mononucléaires que pour les polynucléaires, fait signalé par SAWTCHENKO [108] et que nous avons maintes fois constaté. Ceci peut s'expliquer par la mobilité moins grande des mononucléaires, cette propriété de plus grande viscosité de leur surface suppléant à la rapidité moins grande de leurs mouvements.

Envisageons maintenant la seconde phase de la phagocytose, l'englobement; acte vital, phagocytose proprement dite. Voyons d'abord s'il existe un rapport quelconque entre virulence et phagocytabilité *in vitro*. Les auteurs sont d'accord pour reconnaître que les pneumocoques non virulents sont phagocytables tandis que les échantillons virulents sont très difficilement attaqués par les leucocytes: ROSENOW [102], TCHISTOWITCH et JUREWITCH [117], STROUSE [113], LISTER [70], MÉTALNIKOW [80, 83].

Le fait est facile à observer, en gros. La difficulté commence lorsque l'on cherche à voir si, parmi les pneumocoques virulents, les phagocytabilités varient et si ces variations ont un rapport quelconque avec les variations de virulence.

Les pneumocoques A, P6 et K24 (1), complètement avirulents, sont extrêmement phagocytables. Remarquons en passant que ces trois échantillons, le premier du groupe II, les deux autres du groupe IV, furent virulents à l'origine, virulence faible d'ailleurs, et devinrent avirulents après une longue conservation dans les milieux de culture. L'histoire de l'échantillon A est assez curieuse puisque sa faible virulence au départ, après avoir totalement disparu, est remontée pendant quelques mois, pour redescendre ensuite sans raison apparente (COTONI, TRUCHE et Mlle RAPHAEL, 24 *bis*).

Pour A, la phagocytose est très abondante, totale après 1 heure à 37°, avec addition de complément (sérum frais de cobaye non dilué), après sensibilisation soit par du

sérum normal de cheval (dilution au $\frac{1}{10}$) soit par un sérum antipneumococcique (dilutions au $\frac{1}{10}$, au $\frac{1}{100}$, au $\frac{1}{1000}$),

(1) Voir le tableau, au début du chapitre: Pneumocoques.

ou même sans sensibilisation, en cultures en milieu T (voir les exp. V, VI, VII, I).

P6 et K24 sont également très phagocytables: après une demi-heure, tous les microbes sont inclus dans les leucocytes, si les cultures ont été faites en bouillon Martin addi-

tionné de $\frac{1}{10}$ de sérum normal ou de sérum antipneumo-

coccique.

Nutmann, très peu virulent, est aussi très phagocytable, un peu moins cependant, dans les mêmes conditions d'expérience que P6 et K24 (exp. VIII); après 1 heure, il y a encore quelques microbes libres.

La phagocytose des pneumocoques moyennement ou très virulents est toujours très incomplète; elle est faible dans la plupart des cas et, pour l'augmenter, il faut une opsonisation énergique: additon de complément en forte proportion (leucocytes émulsionnés dans du sérum frais de cobaye non dilué), sensibilisation à l'état naissant par du sérum normal de cheval ou mieux par un sérum anti-pneumococcique. En milieu T, le pneumocoque *Denis* ne montre qu'un léger début de phagocytose après 1 heure à 37°, alors que, dans les mêmes conditions, nous venons de voir que A est totalement englobé (exp. I). L'opposition est toujours nette entre les échantillons virulents et avirulents, phagocytabilité intense correspondant toujours avec avirulence (voir aussi les exp. V, VI, VII).

Il est plus difficile de faire se manifester des différences dans les phagocytabilités d'échantillons de virulences assez voisines il est vrai, comme *Laroche* (10^{-3}), *Denis* (10^{-3}) et *Gaillardon* (10^{-4}). Cependant, bien que ces différences soient faibles, on peut constater que *Gaillardon* est presque toujours un peu moins phagocyté que *Laroche* et *Denis* (exp. II et III); on voit quelquefois la phagocytose commencer plus vite pour *Gaillardon* que pour *Denis* (exp. III et IV, après une demi-heure), mais lorsque les conditions d'expé-

rience sont favorables à la phagocytose, celle-ci devient rapidement plus marquée pour le pneumocoque dont la virulence est la plus faible (voir les mêmes expériences après 1 heure et 1 heure et demie, avec addition de complément, en sérum normal).

Les résultats obtenus ont été identiques lorsque les leucocytes de cobaye ont été remplacés par des leucocytes de cheval émulsionnés dans du sérum frais non dilué de cheval.

Cependant, des expériences faites avec deux échantillons de virulences assez différentes: *Denis* (10^{-2}) et *Griffith* (10^{-7}), l'échantillon A servant en quelque sorte de témoin, ne nous ont pas permis d'observer de différence sensible entre leurs phagocytabilités. Ils ne sont pas du tout phagocytés, l'accolement seul est observable, sans sensibilisation préalable, même avec addition de complément; tout au plus *Denis* laisse-t-il voir un faible début de phagocytose après 1 heure, en culture sur sérum de lapin (exp. V). La phagocytose est plus accentuée après sensibilisation par une petite quan-

tité de sérum antipneumococcique (dilution au $\frac{1}{100}$) sans

différence appréciable entre les deux séries d'images (exp. VI). L'un et l'autre pneumocoques sont très peu englobés

si la dilution du sérum sensibilisant atteint $\frac{1}{1000}$; on peut

noter cependant que après 1 heure la phagocytose est un

peu plus accentuée pour *Denis* ($\frac{1}{6}$ des leucocytes contenant

2 à 4 pneumocoques chacun, rares leucocytes en contenant de 5 à 10) que pour *Griffith* (quelques leucocytes seulement contenant 2 à 8 pneumocoques). On voit que ces différences sont faibles.

On peut remarquer que, presque toujours, nous avons ajouté du complément en grande quantité. Son influence favorisante est incontestable. Si la quantité ajoutée est

diminuée de moitié, on voit une diminution nette mais peu considérable du phénomène; mais si le sérum frais de cobaye est dilué au $\frac{1}{10}$ (exp. IV), il n'y a plus ou à peine de microbes englobés après sensibilisation par du sérum normal de cheval; la phagocytose est moins faible après sensibilisation par un sérum spécifique mais reste très inférieure à ce qu'elle est, dans les mêmes conditions, avec addition de complément dilué au demi et à fortiori avec du complément non dilué.

Nous avons l'intention, avons-nous déjà dit, d'étudier l'influence sur la phagocytose *in vitro* de la sensibilisation par les sérums spécifiques, ainsi que les applications pratiques que l'on pourrait en déduire: méthode de titrage *in vitro* des sérums thérapeutiques, en particulier des sérums antipneumococciques (1). Les difficultés rencontrées ne nous ont pas permis d'approfondir la question, que nous n'avons pu qu'ébaucher. Les résultats obtenus ne sont cependant pas sans présenter quelque intérêt.

Le sérum utilisé était un sérum préparé avec un pneumocoque du groupe II (sérum 920-34). La sensibilisation était faite à l'état naissant, ainsi que nous l'avons expliqué au début de ce chapitre. Dans chaque expérience, des témoins étaient faits en remplaçant le sérum antipneumococcique par du sérum normal de cheval. Or, depuis les recherches de DEAN [28], confirmées plus récemment par M. NICOLLE et CÉSARI [96, 100], on sait que ce sérum contient des sensibilisatrices normales actives au point de vue opsonique. Nous avons constaté en effet très nettement leur action favorisante puisque, en leur absence, on ne constate aucun englobement des pneumocoques virulents *Denis et Griffith* (exp. V).

(1) Cette action favorisante des sérums spécifiques a été déjà signalée au point de vue des pneumocoques par NEUFELD et RIMPAU [94], STROUSE [113].

L'influence favorisante du sérum antipneumococcique est beaucoup plus forte; les différences sont nettement visibles dans toutes les conditions d'expérience. La présence du sérum spécifique a parfois pour effet de hâter le début du phénomène, sans que la phagocytose soit ensuite beaucoup plus accentuée que pour le sérum normal (exp. II). Mais, en général, les différences sont nettes et parfois considérables (exp. III et IV). Si le sérum antipneumococcique

est dilué, non plus au $\frac{1}{10}$ mais au $\frac{1}{100}$ (exp. VI), l'intensité de la phagocytose est sensiblement la même, mais, avec une dilution de sérum au $\frac{1}{1000}$ (exp. VII), la phagocytose est notablement diminuée.

De plus, cette action favorisante manifeste une certaine spécificité, fait déjà noté par LISTER [70] qui observa que les sérums opsonisent surtout les pneumocoques du même « cas clinique ». L'action favorisante est plus grande pour *Denis*, du groupe II comme le sérum, que pour *Laroche* (I) et *Gaillardon* (III) (exp. III et surtout IV). Notons que l'échantillon *Denis* pousse fortement agglutiné dans le

bouillon contenant $\frac{1}{10}$ de sérum antipneumococcique. Il

devient difficile à émulsionner, même après broyage au mortier et agitation dans un tube avec des billes de verre (1). *Griffith* pousse aussi en disque cohérent dans le même milieu. L'un et l'autre sont encore agglutinés dans du bouil-

lon additionné de $\frac{1}{100}$ du même sérum. Il ne le sont plus.

(1) Cette action agglomérante a été vue par BORDET en 1896 [9] sur des vibrions agglutinés par un sérum correspondant. Elle avait été constatée auparavant, non pour un sérum thérapeutique mais pour des sérums d'individus vaccinés: CHARRIN et ROGER [19] pour le bacille pyocyanique; МЯТЧНИКОВ [86, 4^r] puis ISSAEV [51] pour le pneumocoque.

qu'à peine lorsque la quantité de sérum est plus faible

¹
(—), mais l'action opsonisante de ce milieu devient aussi
1000

très faible. *Laroche* et *Gaillardon*, bien que ne semblant pas agglutinés macroscopiquement, donnent des émulsions moins homogènes que en sérum normal; or le sérum anti a sur eux une certaine influence. Cette faible agglutination ne se produit pas lorsque le sérum antipneumococcique est ajouté à des cultures adultes de ces derniers échantillons, la sensibilisation à l'état naissant étant de beaucoup la plus énergique.

On peut dire que, d'une manière générale, les sérums antipneumococciques favorisent la phagocytose des pneumocoques virulents dans la mesure où ils les agglutinent à l'état naissant.

EXPÉRIENCE I

Température: 37°.

Leucocytes émulsionnés dans du sérum frais de cobaye (+K).

Cultures en milieu T.

Pneumocoques

Après 1 heure.	A (0).....	+ + + + +
—	<i>Denis</i> (10 ⁻⁸).	+

EXPÉRIENCE II

Température: 37°.

Leucocytes émulsionnés dans du sérum frais de cobaye
dilué au demi ($\frac{K}{2}$).

A) Cultures en bouillon Martin additionné de $\frac{1}{10}$ de
sérum normal de cheval.

B) Cultures en bouillon Martin additionné de $\frac{1}{10}$ d'un
sérum antipneumococcique du groupe II (cheval
920, 34° saignée, agglutine au $\frac{1}{200}$ avec le *Denis*

(II), n'agglutine pas avec le *Laroche* (I), donc
spécifique).

		A) Sérum normal	B) Sérum antipneu- mococcique
après 1/4 d'heure	<i>Laroche</i> (10 ⁻²)...	—	+
—	<i>Denis</i> (10 ⁻³)....	—	+
—	<i>Gaillardon</i> (10 ⁻⁴)..	—	+
après 1/2 heure	<i>Laroche</i>	++	++
—	<i>Denis</i>	+	+
—	<i>Gaillardon</i>	+	+
après 1 heure	<i>Laroche</i>	++	+++
—	<i>Denis</i>	++	++
—	<i>Gaillardon</i>	+	++

EXPÉRIENCE III

Température: 37°.

Leucocytes émulsionnés dans du sérum frais de cobaye (+K).

- A) Cultures en bouillon Martin additionné de $\frac{1}{10}$ de sérum normal équin.
- B) Cultures en bouillon Martin additionné de $\frac{1}{10}$ d'un sérum antipneumococcique (sérum 920-34, voir exp. II).

	Pneumocoques	A) Sérum normal	B) Sérum antipneumococcique
après 1/2 heure	<i>Laroche</i> I (10^{-3})...	—	+
—	<i>Denis</i> II (10^{-3})....	—	+
—	<i>Gaillardon</i> III (10^{-4})	+	+
après 1 heure	<i>Laroche</i>	++	++
—	<i>Denis</i>	++	+++
—	<i>Gaillardon</i>	+	++
après 1 h. 1/2	<i>Laroche</i>	++	+++
—	<i>Denis</i>	+++	++++
—	<i>Gaillardon</i>	+	++

EXPÉRIENCE IV

Température: 37°.

Leucocytes émulsionnés dans du sérum frais non dilué de cobaye (+K).

Leucocytes émulsionnés dans du sérum frais de cobaye
dilué au demi ($+\frac{K}{2}$).

Leucocytes émulsionnés dans du sérum frais de cobaye
dilué au dixième ($+\frac{K}{10}$).

A) Cultures en bouillon Martin $+\frac{1}{10}$ de sérum normal
de cheval.

B) Cultures en bouillon Martin $+\frac{1}{10}$ de sérum anti-
pneumococcique (920-34).

Pneumocoques		A) Sérum normal		
		+K	$+\frac{K}{2}$	$+\frac{K}{10}$
après 1/2 heure	<i>Denis</i> II (10^{-3})....	—	—	—
—	<i>Gaillardon</i> III (10^{-4})	+	+	—
après 1 heure	<i>Denis</i>	+	—	—
—	<i>Gaillardon</i>	+	+	+
après 1 h. 1/2	<i>Denis</i>	+++	—	+
—	<i>Gaillardon</i>	+	+	+

Pneumocoques		B) Sérum anti- pneumococcique		
		+K	$+\frac{K}{2}$	$+\frac{K}{10}$
après 1/2 heure	<i>Denis</i> II (10^{-3})....	++		—
—	<i>Gaillardon</i> III (10^{-4}) +		+	+
après 1 heure	<i>Denis</i>	++++	++++	+
—	<i>Gaillardon</i>	++	+	+

après 1 h. 1/2	<i>Denis</i>	++++	+++	++
—	<i>Gaillardon</i>	++	+	+

EXPÉRIENCE V

Température: 37°.

Leucocytes émulsionnés dans du sérum frais de cobaye (+K).

A) Cultures en milieu T.

B) Cultures en sérum pur de lapin (2 passages).

	Pneumocoques	A) milieu T	B) Sérum de lapin
après 1/2 heure	<i>A I (0)</i>	+++	++ ++
—	<i>Denis II (10⁻³)</i> ...	—	—
—	<i>Griffith II (10⁻⁷)</i> .	—	—
après 1 heure	<i>A</i>	++++	++ +++
—	<i>Denis</i>	—	+
—	<i>Griffith</i>	—	—

EXPÉRIENCE VI

Température: 37°.

Leucocytes émulsionnés dans du sérum frais de cobaye non dilué (+K).

Cultures en bouillon Martin additionné de $\frac{1}{100}$ de sérum antipneumococcique (920-34).

Pneumocoques

après 1/2 heure	<i>A II (0)</i>	+++
—	<i>Denis II (10⁻³)</i> ...	++
—	<i>Griffith II (10⁻⁷)</i> .	++

après 1 heure	A	++++
—	<i>Denis</i>	+++
—	<i>Griffith</i>	+++

EXPÉRIENCE VII

Température: 37°.

Leucocytes émulsionnés dans du sérum de cobaye non dilué (+K).

Cultures en bouillon Martin additionné de $\frac{1}{1000}$ de sérum antipneumococcique (920-34).
Pneumocoques

après 1/2 heure	A (0)	++++
—	<i>Denis</i> (10^{-3}).....	+
—	<i>Griffith</i> (10^{-7})....	+
après 1 heure	A	+++++
—	<i>Denis</i>	++
—	<i>Griffith</i>	+

EXPÉRIENCE VIII

Température: 37°.

Leucocytes émulsionnés dans du sérum frais de cobaye non dilué (+K).

- A) Cultures en bouillon Martin additionné de $\frac{1}{10}$ de sérum normal de cheval.
- B) Cultures en bouillon Martin additionné de $\frac{1}{10}$ de sérum antipneumococcique (920-34).

	Pneumocoques	A) Sérum normal	B) Sérum antipneumococcique
après 1/2 heure	<i>Nutmann</i> (10 ⁻⁷)..	++ ++	++++
—	<i>P6</i> (0).....	++ ++	+++ +
—	<i>K24</i> (0).....	+++++	+++++
après 1 heure	<i>Nutmann</i>	++ ++	++++
—	<i>P6</i>	+++ ++	+++++
—	<i>K24</i>	+++++	+++++

2° Streptocoque

Les échantillons étudiés ont été les suivants:

Echantillons	Origine	Virulence sur le lapin)
<i>Bonot</i>	aviaire	10 ⁻⁸ (1)
<i>Goulin</i>	id.	10 ⁻⁵
<i>Truche</i>	id.	0
<i>Parrot</i>	humaine	1 cc.
<i>Antoni</i>	id.	1 cc.
<i>Léon</i>	id.	0

(1) Nota: 10^{-8} cent. c. = $\frac{1}{10^8}$ cc. = $\frac{1}{100.000.000}$ cent. cube.

Les expériences de phagocytose ont été faites avec des cultures de 24 heures. Les cultures étaient conservées à la glacière, soit en sérum pur de lapin dans des ampoules, soit par le même procédé de conservation que les pneumocoques.

Les milieux des cultures en expérience ont été:

- Bouillon Martin seul ou additionné de $\frac{1}{10}$ de sérum normal de cheval.
- Bouillon Martin glucosé à 2 pour 1.000.
- Milieu T.
- Sérum pur de lapin.

L'intensité maxima du phénomène étant atteinte après une demi-heure de contact, nous avons fait des préparations colorées après un quart d'heure et après une demi-heure de contact à la température choisie. Celle-ci fut en général 30°, le phénomène étant trop rapide à 37°.

Les streptocoques, même virulents, sont des microbes très phagocytables, si nous comparons les résultats obtenus avec ceux que nous ont donnés les pneumocoques. *In vivo* « le streptocoque peu pathogène est un organisme phagocyté activement par les leucocytes; au contraire, le streptocoque pathogène ou virulent est laissé en liberté », écrivait MARCHAND en 1898 [75], observation déjà faite par DENYS et LECLEF [29] et par BORDET [10] et confirmée plus tard par METCHNIKOFF [88]. LÖHLEIN [71, 72] vit des streptocoques virulents légèrement phagocytables *in vitro*, mais toujours moins que des streptocoques avirulents. La sensibilisation de ces microbes par un sérum de lapin vacciné les rendrait capables d'être englobés par des leucocytes de lapin: NEUFELD et RIMPAU [94].

Avec notre technique, nous avons toujours vu les streptocoques même virulents comme *Bonot* et *Goulin* plus ou moins phagocytés. Pour ralentir le phénomène, nous avons opéré à 30°, la phagocytose étant considérable, même après un quart d'heure, à 37° (exp. I). Nous avons diminué la

quantité de complément en diluant au demi avec de l'eau salée à 9 pour 1000 le sérum frais de cobaye, émulsionnant des leucocytes.

Quelques expériences (II et III par exemple), l'une et l'autre avec des cultures en bouillon Martin glucosé, ne nous ont permis de noter aucune différence entre la phagocytabilité des échantillons virulents *Bonot* et *Goulin* d'une part, et de l'échantillon avirulent *Truche* d'autre part. La phagocytose est rapidement considérable avec le complément dilué au demi et des leucocytes de cobaye (exp. II); elle est notablement plus faible dans des conditions identiques mais avec des leucocytes de lapin (exp. III). Ceci confirme un fait reconnu depuis longtemps: « Les leucocytes du cobaye sont beaucoup moins sensibles que ceux du lapin à l'action répulsive manifestée par le streptocoque... ils se comportent, vis-à-vis du streptocoque, comme des phagocytes plus actifs que ceux du lapin » (BORDET, 10). On constate que, à 37°, avec des cultures en bouillon Martin simple, il y a toujours un peu moins d'englobement pour *Bonot* que pour *Truche* (exp. I). Mais les phagocytabilités, toujours dans le sens inverse des virulences, sont le plus différentes avec des cultures en sérum pur du lapin, après 1 passage dans ce milieu (exp. IV) et surtout 2 passages (exp. V); un plus grand nombre de passages en sérum de lapin n'accentue ni ne diminue ces différences.

On peut voir que, si *Truche* est plus phagocyté que *Bonot* et *Goulin*, on constate rarement de différence sensible entre les images de phagocytose données par ces deux derniers microbes; *Goulin* est même parfois moins englobé que *Bonot*, bien que sa virulence soit beaucoup moindre.

Les échantillons d'origine humaine *Parrot*, *Antoni* et *Léon*, les deux premiers très peu virulents puisqu'il faut 1 cent. cube de leur culture pour tuer un lapin par inoculation sous la peau, le troisième avirulent, sont très phagocytés en cultures en milieu T à 30°. La phagocytose

est seulement un peu moins marquée pour *Parrot* et *Antoni* que pour *Léon* : phagocytose totale après un quart d'heure pour celui-ci, alors que quelques microbes sont encore libres après le même temps pour les deux autres.

La proportion des microbes inclus dans les leucocytes diminue considérablement si l'on abaisse la température de l'expérience à 22° et si l'on opère avec des cultures en sérum pur de lapin; l'expérience VII nous donne les résultats obtenus après 2 passages dans ce milieu de culture. On peut remarquer que la phagocytose est bien plus intense après un quart d'heure de contact pour *Antoni* que pour les deux autres types, elle n'augmente plus d'ailleurs ensuite mais reste un peu plus accentuée encore après une demi-heure.

De même que pour les pneumocoques, phagocytabilité et virulence sont donc, en général, ici encore en raison inverse, mais les degrés de phagocytabilités sont plus rapprochés pour les streptocoques, microbes plus facilement attaqués par les leucocytes même lorsque leur virulence est très grande. On doit donc se contenter d'approximations grossières quant à la déduction de la virulence d'un échantillon d'après sa phagocytabilité *in vitro*.

Les cultures en sérum pur de lapin semblent les plus favorables pour accentuer les différences existant entre les phagocytabilités de divers types de streptocoques. Un fait très important doit être rapporté à ce sujet. On sait que certains microbes ont la propriété de s'entourer d'une gaine, d'une auréole ou capsule, lorsque le milieu contient des substances albuminoïdes, dans les humeurs *in vivo* par conséquent, et aussi dans les milieux de cultures riches en sérum. D'autre part, maints auteurs sont d'accord pour penser que la capsule est un gros obstacle à l'englobement par un leucocyte du microbe qu'elle entoure; pour la bactérie charbonneuse: SAWTCHENKO [104], STIENNON [112], LEVADITI [65], WOLLMANN [123], MARGINESU [76]; pour

le streptocoque: BORDET [8, 10, 13], METCHNIKOFF [88], LEVADITI [65]. Selon ces auteurs, les microbes capsulés ne peuvent être phagocytés. Or, nous avons pu constater que, cultivés en sérum de lapin, tous les échantillons de streptocoques étudiés, plus ou moins virulents ou totalement avirulents, étaient entourés d'une capsule en auréole très nette, alors qu'ils étaient plus ou moins phagocytés. Ce fait que « capsulogénèse » et « virulence » marchent toujours de pair, mis en doute par M. NICOLLE et CÉSARI [99] semble donc erroné dans le cas des streptocoques.

Dans la phagocytose *in vitro* des streptocoques comme dans celle des pneumocoques, l'influence favorisante du complément est très grande. Il suffit de jeter un coup d'œil sur les tableaux résumant les expériences II et III pour s'en convaincre. La phagocytose est toujours nettement plus faible lorsque le sérum frais de cobaye est dilué au $1/10^{\circ}$ que lorsqu'il est dilué seulement de moitié.

EXPÉRIENCE I

Température: 37° .

Leucocytes émulsionnés dans du sérum frais de cobaye dilué au demi ($+\frac{K}{2}$).

A) Cultures en bouillon Martin simple.

B) Cultures en bouillon Martin additionné de $\frac{1}{10}$ de sérum normal de cheval.

(A et B donnant exactement les mêmes résultats, nous ne les reproduisons pas deux fois.)

Streptocoques

après 1/4 d'heure	<i>Bonot</i> (10 ⁻⁸)....	+++
—	<i>Truche</i> (0).....	+++++
après 1/2 heure	<i>Bonot</i>	+++++
—	<i>Truche</i>	+++++

EXPÉRIENCE II

Température: 30°.

A) Leucocytes émulsionnés dans du sérum frais de
cobaye dilué au $\frac{1}{10}$ $\frac{K}{10}$ ($\frac{K}{10}$).

B) Leucocytes émulsionnés dans du sérum frais de
cobaye dilué au demi $\frac{K}{2}$ ($\frac{K}{2}$).

Cultures en bouillon Martin glucosé à 2 pour 1000.

Streptocoques		K A. (+—)	K B. (+—)
		10	2
après 1/4 d'heure	<i>Bonot</i> (10 ⁻⁸)....	++	+++
—	<i>Goulin</i> (10 ⁻⁵)...	+	+++
—	<i>Truche</i> (0).....	++	+++
après 1/2 heure	<i>Bonot</i>	+++	+++
—	<i>Goulin</i>	+++	+++
—	<i>Truche</i>	+++	+++

EXPÉRIENCE III

Mêmes conditions de température, d'addition de complément, de milieu de culture que pour l'expérience II.
Mais les leucocytes de lapin remplacent ceux de cobaye.

		K	
Streptocoques		A. (+—)	B. (+—)
		10	2
après 1/4 d'heure	<i>Bonot</i> (10 ⁻⁸)....	+	++
—	<i>Goulin</i> (10 ⁻⁸)...	+	++
—	<i>Truche</i> (0).....	+	++
après 1/2 heure	<i>Bonot</i>	++	++ +
—	<i>Goulin</i>	++	++ +
—	<i>Truche</i>	++	++ +

EXPÉRIENCE IV

Température: 30°.

Leucocytes émulsionnés dans du sérum frais de cobaye
dilué au demi (+—).
K
2

Cultures en sérum pur de lapin (1 passage).

(Remarque : Les trois streptocoques, virulents et avirulent, sont également capsulés).

Streptocoques

après 1/4 d'heure	<i>Bonot</i> (10 ⁻⁸)....	++
—	<i>Goulin</i> (10 ⁻⁸)...	++
—	<i>Truche</i> (0).....	++ +

après 1/2 heure	<i>Bonot</i>	+++
—	<i>Goulin</i>	+++
—	<i>Truche</i>	+++++

EXPÉRIENCE V

Les conditons expérimentales sont les mêmes que dans l'expérience IV, mais les cultures en sérum pur de lapin ont été faites à partir d'autres cultures en sérum pur de lapin (2 passages).

Streptocoques

après 1/4 d'heure	<i>Bonot</i> (10 ⁻⁸)....	++
—	<i>Goulin</i> (10 ⁻⁸)...	+
—	<i>Truche</i> (0).....	+++++
après 1/2 heure	<i>Bonot</i>	+++
—	<i>Goulin</i>	++
—	<i>Truche</i>	++ ++

EXPÉRIENCE VI

Température: 30°.

Leucocytes émulsionnés dans du sérum frais de cobaye
K
dilué au demi (+—).

2

Cultures en milieu T.

Streptocoques

après 1/4 d'heure	<i>Parrot</i> (1 cc.)..	+++
—	<i>Antoni</i> (1 cc.)..	++ ++
—	<i>Léon</i> (0)	++ +
après 1/2 heure	<i>Parrot</i>	+++++
—	<i>Antoni</i>	+++++
—	<i>Léon</i>	++ ++

EXPÉRIENCE VII

Température: 22°.

Leucocytes émulsionnés dans du sérum frais de cobaye
dilué au demi ($+\frac{\text{K}}{2}$).

Cultures en sérum pur de lapin (2 passages).

(Remarque : Comme les types *Bonot*, *Goulin* et *Truche* (exp. IV et V), les trois streptocoques d'origine humaine, peu ou pas virulents, sont capsulés.)

Streptocoques

après 1/4 d'heure	<i>Parrot</i> (1 cc.)..	+
—	<i>Antoni</i> (1 cc.)..	+++
—	<i>Léon</i> (0).....	+
après 1/2 heure	<i>Parrot</i>	++
—	<i>Antoni</i>	+++
—	<i>Léon</i>	++

3° Rouget

Les expériences ont été faites avec un échantillon très virulent tuant la souris à 10⁻⁸ par injection sous-cutanée et comparativement avec des cultures de cet échantillon plus ou moins atténuées en vue de la vaccination des porcs contre l'infection causée par ce bacille. Nous avons donc:

- Rouget virulent
- 2° vaccin
- 1^{er} vaccin.

Les cultures étaient faites en bouillon préparé par M. STAUB (bouillon Martin simple dans lequel on a fait

digérer du sérum d'alcalinité très faible, de $PH=7,4$, une alcalinité plus grande du milieu étant défavorable à la croissance de ce microbe).

On sait que le bacille du rouget du porc, vu pour la première fois dans les leucocytes par METCHNIKOFF [86, 1^{er}] est très phagocytable. A l'autopsie, on le trouve surtout inclus dans les leucocytes. Il n'y aura donc rien d'étonnant à ce qu'on le voit englobé très rapidement par les phagocytes, *in vitro*. C'est en effet ce que nous avons observé. Pour ralentir le phénomène, nous avons opéré à la température de 25°.

Nous n'avons pu, à aucun moment des expériences, constater de différence entre la phagocytabilité du Rouget virulent et celle de ses vaccins.

Cette phagocytabilité est considérable lorsque l'on ajoute une assez grande quantité de complément (sérum frais de cobaye dilué au demi): très peu de bacilles sont libres déjà après un quart d'heure de contact, tous sont inclus dans les phagocytes après une demi-heure. Bacilles virulents et atténués sont beaucoup moins phagocytés en l'absence du sérum frais de cobaye. L'activité complémentaire est donc encore ici incontestable.

Expérience faite à 25°.

A) Leucocytes émulsionnés dans de l'eau physiologique (sans K).

B) Leucocytes émulsionnés dans du sérum frais de cobaye dilué au demi ($+\frac{K}{2}$).

	A. (sans K)	B. ($+\frac{K}{2}$)
apr. 1/4 d'h. Rouget virulent (10 ⁻⁶)	+	+++
— 2 ^e vaccin.....	+	+++
— 1 ^{er} vaccin.....	+	+++

après 1/2 heure	Rouget virulent..	+++	+++ ++
—	2 ^e vaccin.....	+++	+++++
—	1 ^{er} vaccin.....	+++	+++++
après 1 heure	Rouget virulent..	+++	++ +++ +
—	2 ^e vaccin.....	++ +	++ +++ +
—	1 ^{er} vaccin.....	++ +	+++++

4° Charbon

De même que pour le bacille du rouget du porc, les cultures de bactériidies charbonneuses atténuées pour la vaccination nous ont servi d'échantillons avirulents. Nous avons donc, dans l'ordre des virulences décroissantes :

Charbon virulent
2^e vaccin
1^{er} vaccin.

Les cultures de conservation, sur gélose, ont été ensemencées en bouillon Martin glucosé, milieu dans lequel les cultures sont assez riches; les émulsions étant plus faciles à préparer à partir de cultures en milieu liquide.

La température des expériences a été 37°.

METCHNIKOFF a vu des bactériidies charbonneuses phagocytées par des globules blancs de pigeons [86, 2°] et de rats blancs [86, 3°]; LÖHLEIN, avec la technique de WRIGHT, a observé des phagocytoses *in vitro* du charbon par des leucocytes de cobaye et des leucocytes humains [71, 72]. Nous avons dit, à propos du streptocoque que la capsule est considérée par beaucoup d'auteurs comme un moyen de protection des bactériidies contre les leucocytes. Pour notre part, nous n'avons pas vu cette capsule, le milieu de culture ne contenant pas de substances albuminoïde.

Nous n'avons observé non plus aucune phagocytose pour l'échantillon virulent.

Il y a opposition frappante entre la phagocytabilité des échantillons atténués d'une part et celle de l'échantillon virulent d'autre part. Alors que, après une heure, il n'y a que peu de bacilles non inclus dans les leucocytes quand il s'agit des 2^e et 1^{er} vaccins, toutes les bactériidies virulentes sont hors des leucocytes après le même temps. On peut observer seulement quelques bacilles accolés autour des globules blancs. Remarquons que les bacilles virulents sont plus gros que les bacilles atténués, ils sont réunis en assez longues chaînettes et on peut y voir beaucoup de bacilles sporulés.

L'addition de complément n'a aucune influence favorisante sur la phagocytose du charbon virulent; elle ne semble en avoir, mais pour celui-ci d'une façon nette et constante, que pour le 2^e vaccin.

Température: 37°.

A) Leucocytes émulsionnés dans de l'eau physiologique (sans K).

B) Leucocytes émulsionnés dans du sérum frais de cobaye dilué au demi ($+\frac{K}{2}$).

		A. (sans K)	B. ($+\frac{K}{2}$)
apr. 1/4 d'heure	Charbon virulent	—	—
—	2 ^e vaccin.....	+	++
—	1 ^{er} vaccin.....	+	+
après 1/2 heure	Charbon virulent	—	—
—	2 ^e vaccin.....	++	+++
—	1 ^{er} vaccin.....	+++	+++

après 1 heure	Charbon virulent	—	—
—	2° vaccin.....	++·+	++ ++
—	1 ^{er} vaccin.....	++++	++ ++

5° *Pneumobacille de Friedländer*

Echantillons étudiés :

N° 16, très virulent : tue la souris à 10^{-7} et le cobaye à 10^{-5} ;
DEUFLED, avirulent.

Les deux échantillons ont été ensemencés en bouillon Martin simple à partir de cultures en gélatine.

Les expériences ont été faites à la température de 37° en suivant la technique habituelle. La décantation du liquide surmontant le culot de centrifugation a dû être faite à la pipette à boule, à cause du peu de cohésion de ce dépôt.

L'échantillon de *Pneumobacille* avirulent est très phagocytable, après addition d'une quantité suffisante de complément. La phagocytose est déjà accentuée après un quart d'heure de contact avec les leucocytes, elle est intense après une demi-heure et totale après une heure. Par contre, nous n'avons jamais vu un seul pneumobacille de l'échantillon n° 16 inclus dans un leucocyte. L'accolement seul est visible.

Dans le cas du pneumobacille de Friedländer, phagocytabilité et virulence sont donc deux caractères absolument opposés.

L'influence favorisante du complément sur la phagocytose de l'échantillon *Deufled* est constante et considérable.

Voici les résultats obtenus dans une de ces expériences.

Expérience faite à 37°.

A) Leucocytes émulsionnés dans de l'eau physiologique (sans K).

B) Leucocytes émulsionnés dans du sérum frais de cobaye (+K).

Pneumobacilles		A. (sans K)	B. (+K)
après 1/4 d'heure	n° 16 souris 10 ⁻⁷		
	cobaye 10 ⁻⁵	—	—
—	<i>Deufled</i>	+	+++
après 1/2 heure	n° 16.....	—	—
—	<i>Deufled</i>	+	++++
après 1 heure	n° 16.....		
—	<i>Deufled</i>	++	++++

6° Paratyphique B

Les échantillons étudiés avaient les virulences suivantes:

S tuait la souris à 10 ⁻¹			
B II	—	—	à 10 ⁻²
π 19	—	—	à 10 ⁻⁴

Les expériences ont été faites avec des cultures en bouillon Martin, cultures petites-filles à partir des cultures de conservation, sur gélose.

La température choisie était 37°.

La paratyphique B est un microbe assez phagocytable. Les différences de phagocytabilité entre les échantillons de virulences variables sont inappréciables (exp. I) ou faibles (exp. II et III); elles sont cependant plus marquées dans l'exp. II; remarquons que π 19, le plus virulent, est aussi le plus phagocyté; dans l'exp. III, le phénomène est plus rapide au début pour B II et surtout π 19 que pour S, mais il y a égalisation ensuite et l'intensité de la phagocytose devient identique pour les 3 échantillons après 1 heure.

Alors que quelques microbes seulement sont inclus dans les leucocytes après une demi-heure, une heure, et même deux heures, lorsque ceux-ci sont émulsionnés dans de l'eau salée à 9 pour 1000 (exp. I et II), la phagocytose est très marquée après le même temps, après addition de sérum frais de cobaye pur ou dilué de moitié (exp. I, II et III). Donc, ici encore, la présence de complément augmente l'intensité du phénomène.

EXPÉRIENCE I

Température: 37°.

A) Leucocytes émulsionnés dans de l'eau physiologique (sans K).

B) Leucocytes émulsionnés dans du sérum frais de cobaye
dilué au demi ($+\frac{K}{2}$).

Paratyphiques B		A. (sans K)	B. ($+\frac{K}{2}$)
après 1/4 d'heure	S (10^{-1}).....	—	+++
—	B II (10^{-2}).....	—	+++
—	π 19 (10^{-4}).....	—	+++
après 1/2 heure	S	+	+++
—	B II	+	+++
—	π 19.....	+	+++
après 1 heure	S	+	++++
—	B II	+	+++
—	π 19.....	+	++++

EXPÉRIENCE II

Température: 37°

A) Leucocytes émulsionnés dans de l'eau physiologique (sans K).

B) Leucocytes émulsionnés dans du sérum pur de cobaye (+K).

Paratyphiques		A. (sans K)	B. (+K)
après 1/4 d'heure	S (10^{-1}).....		++
—	B II (10^{-2}).....		++
—	π 19 (10^{-4}).....		+++

après 1/2 heure	S	+++
—	B II	+++
—	π 19.....	++++
après 1 heure	S	+
—	B II	+
—	π 19.....	++

EXPÉRIENCE III

Température: 37°

Leucocytes émulsionnés dans du sérum pur de cobaye (+K).

	Paratyphiques	+K
après 1/4 d'heure	S (10 ⁻¹).....	+
—	B II (10 ⁻²).....	++
—	π 19 (10 ⁻⁴).....	+++
après 1/2 heure	S	++
—	B II	+++
—	π 19.....	+++
après 1 heure	S	+++
—	B II	+++
—	π 19.....	+++

7° Bacille tuberculeux

Les bacilles tuberculeux étudiés au point de vue de leur phagocytabilité *in vitro*, dûs à l'obligeance de M. BOQUET, furent:

Un échantillon très virulent d'origine bovine;

Un échantillon avirulent.

Les expériences ont été faites à 37°, 25° et 8°.

Les émulsions microbiennes étaient préparées de la façon indiquée plus haut (voir chapitre I Technique, émulsions microbiennes). Malgré ce mode spécial d'obtention des émulsions, celles-ci renfermaient encore, à côté des bacilles isolés, quelques amas agglutinés, donc difficilement attaquables par les phagocytes.

La technique de coloration a dû être modifiée de la façon suivante: les préparations sont fixées d'abord par un passage rapide dans la flamme, puis par l'alcool-éther. Elles sont colorées par la méthode de Ziehl: immersion dans la fuchsine phéniquée pendant 15 minutes à la température de 45°; lavage à l'eau, différenciation par l'acide azotique au $\frac{1}{5}$, puis par l'alcool absolu; nouveau lavage à l'eau; coloration du fond au bleu de méthylène et dernier lavage à l'eau.

La présence habituelle des bacilles tuberculeux à l'intérieur des cellules faisait prévoir une phagocytabilité intense, même *in vitro*. Elle l'est, en effet, et non seulement à 37°, mais aussi à 25° et même à 8°. L'addition de complément accélère le phénomène au début; mais, dans toutes les conditions d'expérience, la phagocytose est presque totale

après une demi-heure. On ne peut jamais observer de phagocytose absolument totale par suite de l'agglutination de nombreux bacilles, mais ces amas sont constamment entourés par une couronne de phagocytes; ceci explique fort bien la formation des cellules géantes, moyen de défense de l'organisme qui immobilise ainsi les bacilles tuberculeux.

Voici une expérience de phagocytose, à la température de 25°:

A) Leucocytes émulsionnés dans de l'eau physiologique (sans K).

B) Leucocytes émulsionnés dans du sérum frais de cobaye dilué au demi ($+\frac{K}{2}$).

	B. Tuberculeux	A. (sans K)	B. ($+\frac{K}{2}$)
après 1/4 d'heure	virulent	++	+++
—	avirulent	++	+++
après 1/2 heure	virulent	++++	+++
—	avirulent	++++	+++

8° Gonocoque

Quatre types furent examinés au point de vue phagocytose:

Gégou

Conjonctivite

Sin

Lebin

Les émulsions ont été faites avec des cultures de 48 heures sur gélose ascite. La température fut 37°, la seule qui permette de conserver la vitalité de ces microbes, très fragiles en dehors de l'organisme vivant.

L'examen rapide du tableau ci-dessous montre que le gonocoque est extrêmement phagocytable, ce qui n'est pas pour nous étonner, puisqu'on le voit souvent dans les leucocytes. Un fait à noter: après 1 heure de contact, le nombre des microbes inclus semble moins élevé que après une demi-heure, les microbes non englobés demeurant rares ou nuls. Ceci provient sans doute d'une digestion rapide faisant disparaître une partie des éléments phagocytés.

Température: 37°.

Leucocytes émulsionnés dans du sérum frais de cobaye
dilué au demi ($\frac{K}{2}$).

Gonocoques		$\frac{K}{2}$
		$+\frac{K}{2}$
après 1/2 heure	<i>Gégou</i>	+++++
—	<i>Conjonctivite</i> ...	+++++
—	<i>Sin</i>	+++++
—	<i>Lebin</i>	+++++

après 1 heure	<i>Gégou</i>	+ + + + +
- -	<i>Conjonctivite</i> ...	+ + + + +
..	<i>Sin</i>	+ + + + +
—	<i>Lebin</i>	+ + + + +

CHAPITRE III

EXPOSE GENERAL DES RESULTATS.

LEUR INTERPRETATION

Le phénomène de phagocytose, étudié uniquement au point de vue de l'englobement du microbe par le leucocyte, sans considérer les réactions micro-chimiques vitales qui se passent ensuite à l'intérieur du leucocyte, est une affaire de propriétés de surfaces. Les surfaces en présence sont de deux sortes: celle du leucocyte et celle du microbe; la première invariable dans les mêmes conditions d'expérience, la seconde est, dans le problème qui nous intéresse, l'élément variable. Deux facteurs de ces variations sont à envisager: la nature du microbe, sa virulence propre.

De plus, le milieu dans lequel se rencontrent ces deux surfaces les modifie sensiblement. Il y a adsorption par ces surfaces des substances dissoutes dans le milieu qui les baigne, « adsorption régie par deux influences » ont dit M. NICOLLE et CÉSARI [95], « l'étendue de la surface de l'adsorbant et les relations entre la nature de l'adsorbant

et celle de l'adsorbable ». Les substances actives adsorbables sont ici complément et sensibilisatrices, normales ou spécifiques. Selon leur présence ou leur absence, ou leurs actions combinées, le phénomène sera plus ou moins modifié; on peut donc prévoir que ses aspects seront variés.

Nous allons voir comment interpréter les résultats exposés dans le précédent chapitre en envisageant les quatre points suivants:

- a) LEUCOCYTES et PHAGOCYTOSE IN VITRO.
- b) MICROBES ET PHAGOCYTOSE IN VITRO.
- c) INFLUENCE DU COMPLEMENT SUR LA PHAGOCYTOSE IN VITRO.
- d) INFLUENCE DES SENSIBILISATRICES SUR LA PHAGOCYTOSE IN VITRO.

a) LEUCOCYTES ET PHAGOCYTOSE IN VITRO

L'expérience nous a montré que, avec notre technique, les leucocytes de cobaye étaient un réactif invariable, puisque, toutes les fois où nous avons opéré avec les mêmes microbes dans les mêmes conditions de température et de milieu, nous avons obtenu des résultats identiques.

Les leucocytes de cheval se sont montrés analogues à ceux de cobaye pour la phagocytose des pneumocoques. Par contre, les globules blancs de lapin furent moins actifs au point de vue phagocytaire que ceux du cobaye, vis-à-vis du streptocoque.

Les mononucléaires, les «macrophages» de METCHNIKOFF, sont, ainsi que nous l'avons déjà dit, en faible proportion dans l'exsudat péritonéal, lorsque la « préparation » du cobaye a été opérée de 20 à 24 heures avant l'expérience de phagocytose. Leur nombre est d'ailleurs assez variable, mais reste toujours faible par rapport à celui des polynucléaires « microphages ». Par contre, ils sont souvent plus prompts que ceux-ci à englober les microbes, sans que, lorsque le phénomène s'accroît ensuite, ils soient plus actifs que ceux-ci au point de vue phagocytaire.

Nous avons déjà signalé que la phase d'accolement était souvent plus visible pour les mononucléaires; on les voit parfois complètement entourés par une couronne de cocci ou de bacilles collés à leur surface.

b) MICROBES ET PHAGOCYTOSE IN VITRO

Les deux facteurs influant sur la phagocytabilité d'un microbe donné étant: 1° sa nature; 2° sa virulence, la question se présente sous deux aspects:

1° Classification des microbes en regard de leur phagocytabilité;

2° Pour un microbe donné, rapport entre phagocytabilité et virulence.

1° Classification des microbes en regard de leur phagocytabilité

On peut se faire une idée des grandes différences existant entre les phagocytabilités des espèces microbiennes étudiées

en comparant les tableaux commentés dans le cours du chapitre précédent: Il ne faut pas oublier cependant que les conditions d'expériences sont très variables suivant les cas. Pour certains microbes particulièrement résistants à l'attaque des leucocytes, les pneumocoques par exemple, le premier prélèvement pour l'examen a été fait seulement après une demi-heure de contact, alors que cette première observation a été faite après un quart d'heure pour les autres microbes. Pour les pneumocoques encore, on a dû prolonger l'examen du phénomène jusqu'à une heure et demie après son début, alors que pour d'autres germes (bactéridie charbonneuse, pneumobacille de Friedländer, paratyphique B) le maximum d'intensité est atteint après une heure et que, pour d'autres encore (streptocoque, rouget, bacille tuberculeux, gonocoque) il n'y a plus de changement déjà après une demi-heure de contact.

La température choisie pour ces expériences a été variable, ce dont il faut tenir compte lorsqu'on fait des comparaisons générales, l'influence favorisante sur la phagocytose de l'élévation de la température étant indéniable. Nous avons opéré à 37° pour le pneumocoque, le charbon, le pneumobacille, le paratyphique B, le gonocoque; à 30° pour le streptocoque; à 25° pour le rouget et le bacille tuberculeux.

De plus, les microbes ont été sensibilisés ou non et soumis ou non à l'influence du complément.

Les dissemblances entre ces diverses images de phagocytose auraient été beaucoup plus grandes si les conditions avaient été identiques; mais il s'agissait surtout de modifier l'intensité du phénomène de façon à trouver le « point sensible », celui où l'on peut observer les différences les plus grandes pour une espèce microbienne donnée. Il est évident que ces différences sont peu visibles lorsque les phagocytoses sont nulles ou très faibles, de même que lorsqu'elles sont immédiates et intenses. Il fallait donc,

soit accélérer et accentuer le phénomène par les moyens dont on pouvait disposer: élévation de la température, opsonisation intensive; soit le ralentir, l'abaissement de la température étant le seul moyen à notre disposition.

En tenant compte de ces différences dans les conditions d'expériences, on peut comparer les résistances plus ou moins grandes que présentent les microbes à la phagocytose.

Lorsque nous parlons de classification des microbes au point de vue de leur phagocytabilité, il s'agit seulement des microbes virulents. Nous avons vu, en effet, que les phagocytabilités des échantillons avirulents, étudiés dans chaque espèce microbienne, sont très grandes et tout à fait comparables (voir les échantillons A, P6 et K24 pour le pneumocoque; *Truche* et *Léon* pour le streptocoque; le pneumobacille *Deufled*; les vaccins du rouget et du charbon; le bacille tuberculeux atténué).

Il n'en est pas de même lorsqu'il s'agit de microbes virulents. Nous classerons ainsi ceux que nous avons étudiés:

MICROBES TRÈS PHAGOCYTABLES:

- Gonocoque,
- Bacille tuberculeux,
- Bacille du Rouget.

Le gonocoque est à peu près totalement englobé par les leucocytes après une demi-heure de contact à 37°.

Pour le bacille tuberculeux, la phagocytose est presque complète à 25°, après une demi-heure, sans addition de

sérum frais de cobaye et déjà après un quart d'heure avec addition d'une dilution au demi de ce même sérum.

La phagocytose est moins rapide et moins accentuée sans addition de complément pour le bacille du rouget, mais elle est totale après une demi-heure avec addition de complément (sérum dilué au demi).

MICROBES MOYENNEMENT PHAGOCYTABLES

— Streptocoque,

— Paratyphique B.

Les streptocoques très virulents montrent une phagocytose très marquée après une demi-heure quand on opère à 30°, avec addition de sérum frais de cobaye dilué au demi.

Pour le paratyphique B, la phagocytose est faible à 37° sans complément, mais elle est accentuée à la même température après addition de complément.

MICROBES PEU PHAGOCYTABLES

— Pneumocoque.

Pour obtenir une phagocytose notable (elle reste parfois faible dans ces mêmes conditions) avec les types très virulents de pneumocoque, il faut opérer à 37°, ajouter une forte proportion de complément (sérum frais de cobaye non dilué) et sensibiliser énergiquement (à l'état naissant) **par un sérum normal de cheval ou mieux par un sérum antipneumococcique.**

MICROBES NON PHAGOCYTABLES

— Charbon,

— Pneumobacille.

A 37°, avec ou sans addition de complément, on n'observe aucun bacille inclus dans les leucocytes, même après une heure de contact avec ceux-ci, sans sensibilisation spécifique il est vrai. Seule la phase d'accolement est visible.

2° Rapport entre Phagocytabilité et Virulence

Il est naturellement impossible de différencier les phagocytabilités des types virulents et avirulents de microbes très phagocyttables: bacille tuberculeux, rouget, gonocoque. La phase d'accolement n'est pas ou à peine visible, l'englobement est rapide et total. Ceci s'explique par l'étude de leur habitat dans l'organisme contaminé: on les trouve *in vivo* le plus souvent à l'intérieur des leucocytes. Le mode de défense de l'organisme contre ces microbes est surtout cellulaire; il existe une affinité spéciale entre eux et les leucocytes; ils présentent un chimiotactisme positif tel que l'englobement est immédiat. La lutte se passe ensuite à l'intérieur des phagocytes. Il y a donc ici correspondance complète entre le phénomène *in vivo* et *in vitro*.

Le cas extrême est celui du charbon et du pneumobacille virulents pour lesquels la phagocytose est nulle. Il y a ici opposition entre ce qui se passe pour l'échantillon avirulent très phagocyttable et pour l'échantillon virulent inattaquable par les leucocytes. Virulence et phagocytabilité sont pour ces deux microbes des caractères absolument opposés.

On remarque peu de différences entre les phagocytabilités des trois échantillons de paratyphique B, de virulences

variées. Il semble cependant que le plus virulent, π 19 (qui tue la souris à 1/10.000^e de cent. c., alors que pour S il faut 0 cc. 1 pour tuer une souris et 0 cc. 01 pour *b* II), soit aussi le plus phagocytable. Dans ce cas, chimiotactisme négatif ne correspondrait pas avec virulence. Ce fait a déjà été signalé à propos de la phagocytose du bacille diphtérique par MASSART [77], puis par GABRICHEWSKY [38], et, plus récemment, par MÉTALNIKOW [83] dans ses expériences sur la phagocytose du streptocoque, du choléra des poules et d'un vibrion par les leucocytes de la chenille des abeilles. En ce qui concerne nos recherches, ce fait est resté isolé.

Pour le streptocoque et le pneumocoque, on constate toujours une différence entre les phagocytabilités des types très virulents et celles des types avirulents, différence plus accentuée naturellement pour les pneumocoques, microbes peu phagocytables, que pour les streptocoques. Pour l'un comme pour l'autre, les types de virulence faible (les streptocoques *Parrot* et *Antoni*, le pneumocoque *Nutmann*) se comportent à peu près de la même manière que ceux qui en sont totalement dépourvus. Parmi les streptocoques virulents, les phagocytabilités sont presque les mêmes, bien que les virulences soient très différentes (10^{-5} et 10^{-8}); de même pour les pneumocoques, faibles différences entre *Laroche* (10^{-3}) et *Denis* (10^{-3}) d'une part, et *Gaillardon* (10^{-4}) d'autre part; différences encore moins grandes entre *Denis* (10^{-3}) et *Griffith* (10^{-7}). Lorsque ces différences existent, elles sont toujours dans le sens inverse des virulences.

On peut donc observer des différences grossières mais il n'y a pas de parallélisme absolu entre la diminution de la phagocytabilité *in vitro* et l'augmentation de la virulence.

c) INFLUENCE DU COMPLEMENT

SUR LA PHAGOCYTOSE IN VITRO

Nous avons vu que les nombreux travaux qui ont suivi ceux de WRIGHT sur les « opsonines » [129] ont conclu à l'identité des opsonines spécifiques et des fixateurs ou sensibilisatrices d'une part, des opsonines normales et des compléments ou alexines d'autre part.

Lorsque l'englobement par les leucocytes a lieu dans l'organisme, le complément agit toujours puisque sa présence y est constante, mais le fait qu'il est indispensable à la phagocytose hors de l'organisme a été nié par beaucoup d'auteurs, ainsi que le notaient récemment M. NICOLLE et CÉSARI [96]. Or, nous avons pu constater que, sans complément, la phagocytose *in vitro* est souvent très faible (voir en particulier les pneumocoques). L'influence de ce facteur est même parfois si considérable qu'il devient le facteur prépondérant dont dépend surtout l'intensité du phénomène, les autres facteurs étant relégués par là même au second plan.

Cette influence favorisante se manifeste également, qu'il s'agisse de microbes virulents ou de microbes avirulents. On la constate le plus facilement sur les microbes peu ou moyennement phagocytables. Elle est nette cependant même pour les germes rapidement englobés, tels les bacilles tuberculeux: la rapidité de l'englobement est augmentée, puis l'intensité du phénomène devient la même après une demi-heure de contact, que le complément soit présent ou

non. Le bacille du rouget est très phagocytable, mais cette phagocytose n'est rapide et totale qu'en présence d'une certaine quantité de complément.

La différence est encore plus grande pour le paratyphique B entre les phagocytoses obtenues sans complément et avec complément: elle est faible, ne commence qu'après une demi-heure de contact entre microbes et leucocytes dans le 1^{er} cas, alors qu'elle est de suite notable, puis presque totale après une heure dans le second.

Le complément favorise encore très nettement la phagocytose des streptocoques virulents et celle des pneumocoques très virulents.

Seuls parmi les microbes étudiés, le charbon et le pneumobacille virulents ne sont pas influencés par ce facteur au point d'être attaqués par les leucocytes. Par contre, si son influence est faible pour les vaccins charbonneux, elle est considérable pour le pneumobacille avirulent.

Ce complément était ajouté sous forme de sérum frais de cobaye, celui du cobaye fournisseur des leucocytes ou bien celui d'un autre animal. Les résultats ont été identiques dans les deux cas. Le sérum frais de cheval ajouté à des leucocytes de cheval a aussi augmenté le nombre de microbes englobés par ces leucocytes.

Nous parlons de complément au lieu de sérum frais de cobaye. Le complément est-il bien l'élément de ce sérum, actif au point de vue phagocytaire? Ne faudrait-il pas songer plutôt à un anticorps naturel d'un sérum normal? Il existe un moyen de résoudre le problème, c'est de voir si l'action favorisante de ce sérum se maintient après un chauffage à 55° prolongé pendant une demi-heure. Une expérience en particulier, faite avec la technique habituelle sur le pneumobacille *Deufled* a donné, avec une émulsion

de leucocytes dans ce sérum chauffé, une phagocytose aussi faible que lorsque les leucocytes étaient émulsionnés dans de l'eau physiologique. Le sérum avait donc perdu toute action opsonisante. Or, on sait que le complément est détruit par un tel chauffage alors que les anticorps sont respectés. Les anticorps normaux du sérum ne peuvent agir sans l'intermédiaire du complément; la destruction de celui-ci entraîne l'inutilisation de ceux-là. Ce n'est donc pas sans fondement que l'on émet l'hypothèse que l'action favorisante sur la phagocytose du sérum frais du cobaye est dûe au complément qu'il renferme.

d) INFLUENCE DES SENSIBILISATRICES

SUR LA PHAGOCYTOSE IN VITRO

L'opsonisation énergique produite par les sérums thérapeutiques (opsonines spécifiques de WRIGHT et DOUGLAS) a été maintes fois constatée. Nous n'avons étudié cette action que sur le pneumocoque et d'une façon très incomplète puisque nous n'avons expérimenté que sur un seul sérum antipneumococcique. Nous nous bornerons donc à rappeler ce qui a déjà été dit au chapitre II Pneumocoques, que ce sérum a toujours favorisé nettement la phagocytose *in vitro* de ces microbes et, plus particulièrement, des pneumocoques du même groupe que ceux qui ont servi à la préparation du sérum étudié.

Nous avons vu, de plus, que le pouvoir opsonique et le pouvoir agglutinant de ce sérum marchent de pair. Or, il

n'y a aucune corrélation entre le pouvoir agglutinant d'un sérum antipneumococcique et son pouvoir thérapeutique vis-à-vis de la souris. Il en sera donc de même pour son pouvoir favorisant de la phagocytose. Une méthode de titrage basée sur la phagocytose devient, par conséquent, sans intérêt pratique pour de tels sérums.

CONCLUSIONS

La technique définitivement adoptée est suffisamment simple, pratique, rapide, et donne des résultats bien comparables.

La méthode consiste à mettre en contact des leucocytes de cobaye d'une part, des microbes d'autre part, les uns et les autres sous forme d'émulsions.

Les leucocytes sont obtenus en provoquant la formation d'un exsudat par injection, dans le péritoine d'un cobaye, d'une émulsion de farine lactée. On dilue cet exsudat épais au moyen d'eau citratée stérile, centrifuge le mélange, puis émulsionne les leucocytes, soit dans de l'eau salée à 9 pour 1000, soit dans du sérum frais de cobaye (complément) pur ou plus ou moins dilué.

Les émulsions microbiennes sont faites avec des microbes non chauffés (cultures de 24 heures) et de l'eau salée à 9 pour 1000.

Deux gouttes de chacune de ces émulsions, leucocytaire et microbienne, sont mélangées dans des séries de petits tubes, puis abandonnées au repos, à des températures convenablement choisies, pendant des temps plus ou moins longs.

Le liquide est ensuite décanté, le culot adhérent aux parois des tubes aspiré au moyen de pipettes capillaires,

puis étalé sur lames. Après fixation à l'alcool-éther, on colore ces préparations à la thionine phéniquée et on les examine au microscope.

Cette technique ne nécessite pas un matériel compliqué. Les diverses opérations sont simples et il suffit d'un peu d'habitude pour obtenir d'une manière régulière de bonnes préparations. Leur interprétation, quelque peu délicate, devient cependant facile, lorsqu'on a acquis l'expérience de la technique.

Une détermination de phagocytose *in vitro* dans ces conditions est assez rapide. L'expérience en elle-même ne dépasse pas en général une durée de une heure et demie à deux heures, observation microscopique comprise. Elle doit seulement être préparée 24 heures auparavant, deux opérations devant être faites à ce moment : la « préparation » d'un cobaye au point de vue de la récolte leucocytaire et le repiquage des cultures à examiner dans le milieu convenable.

Les résultats obtenus sont comparables. Les leucocytes se comportent toujours de la même façon lorsque les conditions expérimentales sont identiques. Ces conditions peuvent varier dans de larges limites, la souplesse de la méthode étant suffisante : l'accélération ou l'intensification du phénomène peuvent être obtenues aussi bien que son ralentissement.

La sensibilisation énergétique des pneumocoques virulents, à l'état naissant, par les sérums normaux et surtout spécifiques, a permis d'observer des phagocytoses *in vitro* de ces microbes, peu phagocytés dans d'autres conditions.

b) La Phagocytabilité *in vitro* d'un microbe donné est un caractère spécifique et constant dans des conditions expérimentales identiques.

On peut donc ajouter ce caractère à la liste de ceux dont l'ensemble constitue la personnalité propre d'une espèce microbienne donnée. Il ne faut pas oublier, évidemment, de noter les conditions exactes dans lesquelles se trouve placé un microbe lorsqu'on le juge peu phagocytable, moyennement ou très phagocytable. Ce caractère n'a de valeur comparative, lorsqu'il s'agit, soit de deux microbes différents (streptocoque et pneumobacille, par exemple), soit de deux types de la même espèce microbienne, que si les conditions dans lesquelles on l'a déterminé ont été identiques dans les deux cas.

c) La Phagocytabilité *in vitro* est, pour certains microbes, en raison inverse de leur virulence.

Les bactéries avirulentes sont toutes très facilement phagocytées. Les bactéries virulentes le sont peu ou pas du tout. Il semble qu'à mesure que la virulence augmente, la phagocytabilité *in vitro* diminue, mais pas proportionnellement à l'augmentation de la virulence. Théoriquement, il devrait exister une virulence, variable pour chaque bactérie, pour laquelle la phagocytabilité soit nulle. Pratiquement, il n'en est pas toujours ainsi: pour le bacille tuberculeux, le rouget du porc, le gonocoque, microbes qui peuvent vivre dans les cellules, par exemple. L'adaptation de l'organisme à la lutte contre les microbes affecte un aspect différent suivant ces microbes. Le chimiotactisme produit par certains d'entre eux sur les leucocytes est fortement positif. L'englobement est rapide, aussi bien pour un type très virulent que pour un autre, avirulent. Pour ceux-ci, il ne peut y avoir aucun rapport entre phagocytabilité et virulence.

Pour d'autres, au contraire, (charbon, pneumobacille) virulence et résistance absolue à l'englobement vont de pair, de même que avirulence et très grande phagocytabilité.

D'autres encore (pneumocoque, streptocoque) présentent la même opposition, moins marquée toutefois: Les types très virulents sont phagocytés, mais toujours beaucoup moins que les types avirulents ou très peu virulents.

Pour certains, les paratyphiques B, très phagocytables, virulence et phagocytabilité varient parfois dans le même sens, mais sans constance absolue.

Une application pratique de cette méthode à l'évaluation de la virulence d'un germe est possible; mais il faut tenir compte de la nature de ce germe. S'il n'est pas du tout phagocytable, ou peut, dans tous les cas, conclure à sa virulence. Si sa phagocytabilité est extrême, on conclura à son avirulence, sauf dans le cas de microbes pouvant vivre dans les leucocytes. Il sera toujours préférable d'examiner, comparativement, un type de la même espèce microbienne que l'échantillon à étudier, dont la phagocytabilité *in vitro* ainsi que la virulence soient connues.

On aura ainsi une première indication, sans grande précision souvent au point de vue virulence, mais qui peut être utile comme point de départ d'un titrage plus exact, et qui sera surtout précieux par la rapidité relativement grande avec laquelle on aura pu l'obtenir.

Vu : le Doyen,

RADAIS.

Vu : le Président de thèse,

RADAIS.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

P. LAPIE.

BIBLIOGRAPHIE

1. ACHARD et FOIX. — Oponisation des globules rouges par les sérums hémolytiques. *C. R. Soc. Biologie*, t. LXXII 1912, p. 18.
2. ACHARD et RAMOND. — Recherches sur la résistance leucocytaire. *C. R. Soc. Biol.*, t. LXVI 1909, p. 110.
3. ARKIN. — The influence of certain oxidizing agents (sodium iodosobenzoate and sodium iodoxybenzoate) on Phagocytosis. *J. of Inf. dis.*, t. XI 1912, p. 427.
4. BARIKINE. — Sur le mécanisme de la phagocytose in vitro. *B.I.P.* 1911, p. 963, d'après *Zeitsch. f. Immunitätsf.*, t. VIII.
5. BEZANÇON. — Précis de Microbiologie clinique. *Masson*, 3^e éd. 1920
6. BÖHME. — Untersuchungen über Opsonine. Typhusuntersuch; zum bau der Opsonine; Meningitisuntersuchungen. *Münch. m. Woch.* 1908, n° 28, p. 1475.
7. BORDET. — Les leucocytes et les propriétés actives du sérum chez les vaccinés. *Ann. Institut Pasteur*, t. IX 1895, p. 462.
8. — Recherches sur la phagocytose. *A.I.P.* 1896, p. 104.
9. — Sur le mode d'action des Sérums Préventifs. *A.I.P.* 1896, p. 193
10. — Etude sur la Phagocytose des streptocoques atténués et virulents. *Archives de Médecine exp.* 1898, p. 253.
11. — Les sérums hémolytiques, leurs Antitoxines et les théories des sérums cytolytiques. *A.I.P.* 1900, p. 257.
12. — Sur le mode d'action des sérums cytolytiques et sur l'unité de l'alexine dans un même sérum. *A.I.P.* 1901, p. 303.
13. — Traité de l'Immunité dans les maladies infectieuses. *Masson et Cie*, 1920.
14. BORDET et GENGOU. — Sur l'existence des substances sensibilisatrices dans la plupart des sérums antimicrobiens. *A.I.P.* 1911, p. 289.
15. BULLOCH et ATKIN. — Experiences on the nature of the opsonic action of the blood serum. *Proceed. Roy. Soc.*, t. LXXIV 1905, p. 379.
16. BÜRGERS et MEISNER. — Ueber den Bau der Opsonine, Baketeriotropine und agglutinine. *Zeitsch. f. Immunitätsf.*, t. XI 1911, p. 528.
17. BUSSE. — Ueber die Fehlergroesse und die Fehlerquellen im Opsoninversuch. *D. Med. Woch.* 1909, p. 569.
18. CALMETTE, BOQUET, NÈGRE. — Manuel technique de Microbiologie et Sérologie. *Masson*, 1925.

19. CHARRIN et ROGER. — Développement des microbes pathogènes dans le sérum des animaux vaccinés. *S. Biol.* 1889, p. 667.
20. COMANDON. — Phagocytose in vitro des hématozoaires du calfat (enregistrement cinématographique). *C.R.S.B.*, t. LXXX, 1917, p. 314.
21. — Mouvements des leucocytes et quelques tactismes étudiés à l'aide de l'enregistrement cinématographique. *A.I.P.*, 1920, p. 1.
22. COMANDON, LEVADITI et MUTERMILCH. — Sur la vitesse du mouvement de reptation des leucocytes. *C. R. Soc. B.*, t. LXXIV, 1913, p. 504.
23. COPELLI. — Di un novo metodo opsonico. Teoria opsonica. Di un metodo fagocitario. *Policlinico*, t. XVI, 1909.
24. — Opsonismo et fagocitismo. *Boll. d. Soc. Med. di Parma*, sér. II 1909, B.I.P. 1909, p. 831.
- 24 bis. COTONI, TRUCHE et Mlle RAPHAEL. — Pneumocoques et affections pneumococciques. *Monographies de l'Institut Pasteur*, Masson 1922.
25. COURMONT et DUFOURT. — De la destruction du complément par l'agitation. Absence de pouvoir antihémolytique et réactivation des sérums inactivés après agitation. Résultats comparés de l'agitation du complément dans l'air, l'oxygène, le vide et l'azote. *C.R.S.B.*, t. LXXII 1912, p. 916, 1014, 1058.
26. COWIE et CHAPIN. — I. On the reactivation of heated normal human opsonic serum with fresh diluted serum.
II. The separation of opsonic amboceptor and complement in the cold.
III. Experiments in favor of the amboceptor. Complement structure of the opsonin normal human serum for the staphylococcus albus. *J. of Med. Res.*, t. XVII, f. 1.
27. DANILEWSKY. — Contribution à l'étude des Phagocytes. *Ann. I.P.*, t. IV 1890, p. 432.
28. DEAN. — An experimental inquiry into the nature of the substance in serum with influences phagocytosis. *Proc. Roy. Soc., Biolog. Sc.*, séries B, t. LXXVI, 1905, p. 506.
29. DENYS et LECLEF. — Sur le mécanisme de l'immunité chez le lapin vacciné contre le streptocoque pyogène. *La Cellule*, t. IX, 1895, 1^{er} fasc., p. 206.
30. DENYS et MENNES. — Annales de l'Acad. de Médecine de Belgique, juin 1897.
31. EVANS (Alice C.). — The toxicity of acids for leucocytes as indicated by the tropin reaction. *J. of Immunol.*, t. VII, 1922, p. 271.
32. EVERARD, DEMOOR et MASSART. — Sur les modifications des Leucocytes dans l'infection et dans l'immunisation. *Ann. I.P.*, t. VII, 1893, p. 165.
33. MAC FARLAND. — The nephelometer. *J. Am. Med. Assoc.*, t. XXIV.
34. MAC FARLAND et L'ENGLE. — Observations upon the Phagocytic power of the blood of supposedly normal human beings.

- Commun. faite à la Soc. des Bactériologistes américains. *Ann. Arbor Michigan*, 1905.
35. FENN (Wallace O.). — The Temperature coefficient of Phagocytosis. *J. Gen. Physiol.*, t. IV, 1922, p. 231.
 36. FLEMMING. — Some observations on the opsonic index with spécial reference to the accuracy of the method, and to some of other sources of error. *The Practitioner* n° 5, t. LXXX, 1908.
 37. GABRITCHEWSKY. — Sur les propriétés chimiotactiques des leucocytes. *A.I.P.*, t. IV, 1890, p. 346.
 38. — Du rôle des Leucocytes dans l'infection diphtérique. *A.I.P.*, t. VIII, 1894, p. 671.
 39. GRAHAM. — Observations concerning the effect of ether on phagocytosis. *Trans. of the Chicago path. Soc.*, t. VII, n° 8, 1909.
 40. GRUBER et FUTAKI. — Seroaktivität und Phagozytose. *Münch. med. Woch.*, t. LIII, 1906, p. 249.
 41. HAMBURGER et DE HAAN. — I. Zur Biologie der Phagocyten. Einwirkung isosmotisch-isotonischer und anisotonischer Halogensalzlösungen. *Biosch. Zeitsch.*, t. XXIV, 1910, p. 304.
 II. Wirkung von Erdalkalisalzen auf die Phagocytose. *Biosch. Zeistech.*, t. XXIV, 1910, p. 470.
 III. Zur Biologie der Phagocyten. Einfluss von Ca-Ionen auf die Chemotaxis. *Bioch. Zeitsch.*, t. XXVI, 1910, p. 66.
 42. HAMBURGER, DE HAAN et RUBANOVIC. — Over de invlæd van jodoform, chloroform en andere in vet aplosbare stoffen op de phagocytose. *Koninkl. Acad. van Wetensch*, 1911.
 43. HAMBURGER et HEKMA. — Over Phagocytose. *Koninkl. Acad. v. Wet. te Amsterdam*, 1907.
 44. — I. Quantitative Studien über Phagocytose.
 II. Einfluss von Wasserentzeitung. *Bioch. Zeitschr.*, t. VII, 1907, p. 102, 116.
 45. — Quantitative Studien über Phagocytose. Beitrag zur Biologie der Phagocyten. Einfluss von Ionen. *Bioch. Zeitschr.*, t. IX, f. 3 et 4, p. 275, 306.
 46. — Zur Biologie der Phagocyten. Einfluss von Hämoglobin, chinin, heterogenen serum und Harnstoff auf die Phagocytose. *B. Zeit.* t. IX, f. 5 et 6, p. 512, 521.
 47. HANNEMA. — Onderzoe Kingen over opsoninen. *Thèse de Doctorat Amsterdam*, 1908.
 48. HATA. — Ueber Konstitution und Spezifzität der Opsonine im normalen serum. *Z. f. Hyg.*, t. LXI, f. 1, p. 81.
 49. HEKMA. — Ein Beitrag zur Verwendung von citronensauren Natron im Diemste von Untersuchungen über Phagocytosis. *Bioch. Z.*, t. XI, 1908, p. 177, 185.
 50. HEKTOEN et RUEDIGER. — Studies on Phagocytosis. *J. of. inf. Dis.*, t. II, 1905, p. 128.
 51. ISSAEFF. — Contribution à l'étude de l'immunité acquise contre

- le Pneumocoque. *Ann. Inst. Pasteur*, t. VII, 1893, p. 261.
52. — *Zeitschr. f. Hyg.*, t. XVI, 1894.
53. IRALA. — Ricerche sulla fagocitosi. *Ann. d'Igiene*, t. XXX, 1920.
54. JACOBY (Martin et Margarete). — Ueber die Abhängigkeit der Komplementzerstörung von der Anwesenheit der Sauerstoffs. *Bioch. Zeitschrift*, t. LXIX, 1915, p. 127.
55. JOLLY. — Sur la vitesse du mouvement de reptation des leucocytes. *C.R.S.B.*, t. LXXIV, 1913, p. 504.
56. JOUSSET. — Méthode « opsonique » de Wright. Ses applications au diagnostic, au pronostic et au traitement de la tuberculose. *Bull. médical*, mai 1907.
57. KITE et WHERRY. — The mechanism of Phagocytosis. *J. of inf. Dis.*, t. XVI, 1915, p. 109.
58. KORSCHUN. — Sur l'action bactéricide de l'extrait leucocytaire des lapins et des cobayes. *A.I.P.*, t. XXII, 1908, p. 586.
59. LAMBOTTE et STENON. — Alexines et Leucocytes. *Centrabl. f. Bakt.* t. XL, 1905.
60. LEDINGHAM. — The influence of Temperature on Phagocytosis. *Roy. Soc.*, 1908.
61. LEISHMANN. — *Britisch Med. Journ.*, janvier 1902.
62. — Some experiments in connection with « Stimulins ». *Trans. of the Pathol. Soc. of London*, t. LVI, part. 3, 1905.
63. LE FÈVRE DE ARRIG. — Observation du phénomène d'accolement des microbes aux leucocytes. Sur le facteur microbe dans le phénomène d'accolement. Les propriétés adhésives des leucocytes et de leurs extraits dans le phénomène d'accolement des microbes à ces cellules. *C. R. Soc. B.*, t. LXXXV, p. 671.
64. — Sur la spécificité et les propriétés de l'extrait de leucocytes dans le phénomène d'accolement des microbes. *C. R. Soc. B.*, t. LXXXVI, p. 968, 1922.
65. LEVADITI. — Virulence et capsulogénèse. *Biologie Médicale*, oct. 1913.
66. — Action leucotoxique du Streptocoque des plaies de guerre. Considérations sur le mécanisme de la phagocytose. *C.R.S.B.*, t. LXXXI, 1918, p. 1064.
67. LEVADITI et MUTERMILCH. — Mécanisme de la Phagocytose. *C.R.S.B.*, t. LXVIII, 1910.
68. LEVADITI et INMANN. — a) Contribution à l'étude des opsonines. Propriétés opsonisantes des sérums normaux.
b) Opsonines des sérums spécifiques.
c) Mécanisme de l'opsonisation. *C. R. Soc. B.*, t. LXII.
69. LEVADITI et KOESSLER. — Contribution à l'étude des opsonines normales anti-compléments et anti-opsonines. *C.R.S.B.*, t. LXII.
70. LISTER. — Specific serological reactions with pneumococci from different sources. *Bull. I. P.*, 1914, t. XII, p. 404.
71. LÖKLEIN. — Sur la Phagocytose in vitro des microbes pathogènes. *Ann. I. P.*, t. XIX, 1905, p. 647.

72. — Observations sur la Phagocytose in vitro (2^e mémoire). Influence du serum normal sur le processus phagocytaire (fixateurs normaux). *A.I.P.*, t. XX, 1906, p. 939.
73. MACCO (G. di). — Ricerche sperimentali sulla fagocitosi. Influenza dell' alcool etilico sulla fagocitosi « in vitro » per azione sul siero et sui leucociti. *Hæmatologica*, t. III, 922, p. 546.
74. MADSEN et WULFF. — Influence de la température sur la phagocytose. *A.I.P.*, 1919, p. 437.
75. MARCHAND. — Etude sur la Phagocytose des streptocoques atténués et virulents. *Archives de Méd. exp.* 1898, p. 253.
76. MARGINESU. — Sull' attività fagocitaria dei leucociti di conigli immunizzati contra il carbonchio. *B.I.P.*, t. XX, 1922, p. 899, d'après *Atti R. Acc. dei Fisiocritici*, 1921.
77. MASSART. — Le chimiotactisme des Leucocytes et l'immunité. *A.I.P.*, t. VI, 1892, p. 321.
78. MASSART et BORDET. — Recherches sur l'irritabilité des leucocytes et sur l'intervention de cette irritabilité dans la nutrition des cellules et dans l'inflammation. *A.I.P.*, t. IV, 1890, p. 250.
79. MESNIL. — Sur le mode de résistance des vertébrés inférieurs aux invasions microbiennes artificielles. *A.I.P.*, t. IX, 1895.
80. MÉTALNIKOW. — L'immunité naturelle et acquise chez la chenille de *Galleria Mellonella*. 1^{er} Mémoire, *A.I.P.*, 1920; 2^e mémoire, *A.I.P.*, 1921, p. 363.
81. — Rôle des anticorps dans l'immunité des chenilles, *A.I.P.*, 1923, p. 528.
82. — Les quatre phagocytes de l'*Ascaris Megalocephala* et leur rôle dans l'immunité. *A.I.P.*, 1923, p. 680.
83. Phagocytose et réactions des cellules dans l'immunité. *A.I.P.*, 1924, p. 787.
84. METCHNIKOFF. — Sur la lutte des cellules dans l'organisme contre l'invasion des microbes. *A.I.P.*, 1887, t. I, p. 321.
85. — Sur le rôle phagocytaire des cellules géantes du tubercule. *Wirtchow's Archiv.*, t. CXIII, 1888.
86. — Etudes sur l'immunité. 1^{er} Mémoire, *A.I.P.*, t. III, 1889, p. 289.
- — — — — 2^e — — — — — t. IV, 1890, p. 65.
- — — — — 3^e — — — — — t. IV, 1890, p. 193.
- — — — — 4^e — — — — — t. V, 1891, p. 465.
- — — — — 5^e — — — — — t. VI, 1892, p. 289.
- — — — — 6^e — — — — — t. IX, 1895, p. 439.
87. — L'état actuel de la question de l'Immunité (Rapport au Congrès International de Budapest). *A.I.P.*, t. VIII, 1894.
88. — Traité de l'Immunité, 1901.
89. — Die Lehre von den Phagocyten und deren experimentelle Grundlagen. *Bull. I.P.*, t. II, 1904, d'après *Handbuch der path. Mikroorg.* de Kolle et Wassermann, fasc. XIX, XX.
90. MEYER. — *Berl. Kl. Woch.* n° 20, 1908.
91. MUIR et MARTIN. — The combining properties of opsonins of

normal serum. *Britisch. Med. J.*, t. II, 1907.

92. NEUFELD. — Weitere Untersuchungen über die Wertbestimmung des Genickstarreserums. *Bull. I.P.*, t. VIII, 1910, p. 859, d'après *Arb. a. d. Kais. Gesundh.*, t. XXXIV, 1910, p. 266.
93. NEUFELD et HÜHNE. — Untersuchungen über baktericide Immunität und Phagocytose nebst Beiträgen zur Frage der Komplement-ablenkung. *Arb. a. d. Kais. Ges.*, t. XXV, 1907.
94. NEUFELD et RIMPAU. — Ueber die Antikörper der Streptokokken und Pneumokokken-Immunserum. *D. Medic. Woch.*, n° 40, 1904.
95. NICOLLE (M.) et CÉSARI (E.). — Colloïdes. Catalyse. Antigènes. Anticorps. *Ann. I.P.*, t. XXXVI, 1922, p. 463.
96. — La Phagocytosé. *A.I.P.*, t. XXXVI, 1922, p. 669.
97. — Remarques sur le titrage des sérums thérapeutiques. *A.I.P.*, t. XXXVI, 1922, p. 747.
98. — Comment on diagnostique un microbe pathogène. *A.I.P.*, t. XXXVII, 1923.
99. — Remarques sur la virulence. *A.I.P.*, t. XXXVIII, 1924.
100. — La thérapeutique des maladies infectieuses (vue générale). *A.I.P.*, t. XXXVIII, 1924, p. 759.
101. NOGUCHI (H.). — The influence of the reaction and of dessication upon opsonins. *J. of exp. Med.*, t. IX, 1907, p. 455.
102. ROSENOW (E. C.). — Human pneumococcal opsonin and the anti-opsonin substance in virulent pneumococci. *Journ. of. inf. Dis.* t. IV, 1907, p. 285.
103. SALIMBENI. — Les modifications des globules blancs dans l'immunité acquise. *A.I.P.*, t. XXIII, 1909, p. 558.
104. SAWTCHENKO. — Contribution à l'Etude de l'Immunité. *A.I.P.*, t. XI, 1897, p. 865.
105. — Du rôle des Immunisines (Fixateurs) dans la phagocytose. *A.I.P.*, t. XVI, 1902, p. 106.
106. SAWTCHENKO et BARYKINE. — Sur la Théorie de la Phagocytose (1^{er} mémoire). *Arch. des Sc. Biol.* publiées par l'Inst. Imp. de Méd. exp. de Saint-Pétersbourg, t. XV, 1910, n° 2, p. 145.
107. — Le rôle des Alexines dans le phénomène de la Phagocytose (2^e mémoire). *Id.*, t. XV, 1910, n° 5, p. 418.
108. — Le rôle du Fixateur et de l'Alexine dans le phénomène de l'attraction et de la coagglutination (3^e mémoire). *Id.*, t. XVI, 1911, n° 2, p. 161.
109. SLEESWIJK. — Ueber den Bau der opsonine. *Centrabbl. f. Bakt.*, t. XLVI, 1908, p. 513.
110. SPADOLINI. — L'inattivazione da concentrazione superficiale di anticorpi e di fermenti. *Archivio di Fisiol.*, t. XIII, 1915.

111. STCHASTNY. — Sur la formation des cellules géantes et leur rôle phagocytaire dans la tuberculose des amygdales et de l'épiglotte. *A.I.P.*, t. III, 1889, p. 224.
112. STIENNON. — Absence de phagocytose après l'injection de bacilles encapsulés du charbon bactérien. Etat des leucocytes en présence des bacilles encapsulés du charbon. *C.R.S.B.*, t. LXII, 1907, p. 821.
113. STROUSE. — Phagocytic immunity in pneumococcus infections and in pneumonia with relation to the crisis. *J. of exp. Med.*, t. XIV, 1911, p. 109.
114. STRUBELL. — Ueber opsonische Technik. *Deutsche Med. Woch.*, 1908, p. 821.
115. STUBER. — Ueber Blutlipöide und Phagocytose. *Bioch. Zeitschr.*, t. LI, 1913, p. 211, et t. LIII, 1913, p. 493.
116. TARASSÉVITCH. — Sur les cytases. *A.I.P.*, t. XVI, 1902, p. 127.
117. TCHISTOWITCH et JUREWITCH. — Des opsonines et antiphagines dans les infections à pneumocoques. *C.R.S.B.*, t. LXIV, 1908.
118. TUNNICLIFF (R). — The influence of cholestérol on phagocytosis. *J. of inf. dis.*, t. XXXIII, 1923, p. 285.
119. VAN DE VELDE. — Contribution à l'immunisation des lapins contre le staphylocoque et le streptocoque pyogène. *A.I.P.*, t. X, 1896.
120. WERIGO. — Les globules blancs comme protecteurs du sang. *A.I.P.*, t. VI, 1892, p. 478.
121. WHITE (A. H.). — Note on the experimental error in the method of determining the tuberculo-opsonic index of the blood. *The Practitioner*, t. LXXX, f. 5, 1908.
122. WOLF (E. P.). — Experimental studies on inflammation. The influence of chemicals upon the chemotaxis of Leucocytes in vitro. *J. of exp. Med.*, t. XXXIV, f. 4, 1921, p. 375.
123. WOLLMANN. — Sur la modification d'une souche microbienne par la sélection des germes phagocytibles. *A.I.P.*, t. XXXIII, 1919, p. 389.
124. WOLRAVENS. — Contribution à l'étude des opsonines. *Bull. Ac. Roy. Méd. Belgique*, 1920.
125. WRIGHT (A. E.). — *Roy. Soc. Proc.*, 1902.
126. — On further improvements in the procedures for testing and judging by the naked eye of the agglutinating and bacteriolytic effects exerted by the sera of patients suffering from, or preventively inoculated against typhoid fever, Malta fever, and tuberculous affections. *Lancet*, 1903.
127. — On certain new method of blood examination, with some indications of their clinical importance. *Lancet*, 1904.
128. — Studien über Immunisierung und ihre Anwendung in der Diagnose und Behandlungen von Bakterieninfektionen. *Gust. Fischer, Jena. Bull. I.P.* 1909, t. VII.
129. WRIGHT et DOUGLAS. — An experimental investigation of the rôle

of the blood fluids in connection with phagocytosis. *Proceed. Roy. Soc.* vol. LXXII, 1903, p. 358.

130. WRIGHT et DOUGLAS. — Further observations of the « rôle » of the blood fluids in connection with phagocytosis. *Proc. Roy. Soc.*, t. LXXIII, 1904.
131. ZILBERGER et ZELIONY. — De la chimiotaxie des leucocytes des lapins infectés par la culture pure de bacilles du choléra des poules. *Ann. Institut Pasteur*, t. XV, 1901, p. 615.
-

